THÈSE DE DOCTORAT D'ÉTAT
ES SCIENCES PHYSIQUES

présentée à la

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

par

Robert F-J Morfin

pour obtenir

le Grade de Docteur Es Sciences

MÉTABOLISME DES ANDROGÈNES AU NIVEAU DES PROSTATES HUMAINES ET CANINES

soutenue le 7 décembre 1970
devant la Commission d'Examen

P. CHAPEVILLE	*président*
E. LEDERER	*assesseur*
J. JACQUES	*assesseur*
P. OFNER	*membre invité*
H.-H. FLOCH	*membre invité*
P. MAUVAIS-JARVIS	*membre invité*

THÈSE DE DOCTORAT D'ÉTAT
ES SCIENCES PHYSIQUES

présentée à la

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

par

Robert F-J Morfin

pour obtenir

le Grade de Docteur Es Sciences

MÉTABOLISME DES ANDROGÈNES AU NIVEAU DES PROSTATES HUMAINES ET CANINES

soutenue le 7 décembre 1970
devant la Commission d'Examen

P. CHAPEVILLE	*président*
E. LEDERER	*assesseur*
J. JACQUES	*assesseur*
P. OFNER	*membre invité*
H.-H. FLOCH	*membre invité*
P. MAUVAIS JARVIS	*membre invité*

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

PROLOGUE

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au cours d'un stage de trois ans dans les laboratoires de Biochimie des Stéroïdes de Harvard Medical School-Harvard Dental School of Medicine, dirigés par le Professeur P. OFNER.

Ce stage a été rendu possible par une bourse accordée par l'OTAN.

Nous présentons nos remerciements à cette organisation et l'assurons de notre vive reconnaissance.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551512_0017

A nos maîtres,

A Monsieur le Professeur E. KAHANE
qui a guidé nos premiers pas en Biochimie et dans la Recherche,

A Monsieur le Docteur M. BURSTEIN
en remerciement pour ses bienveillants conseils et son amical intérêt,

A notre Président de Thèse,

Monsieur le Professeur CHAPEVILLE

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider cette thèse.
Vous nous avez reçu avec simplicité et bienveillance et nous avez prodigué des conseils judicieux, dépensant ainsi un temps précieux.
Croyez à notre reconnaissance et à notre profond respect.

A nos Juges,

Monsieur le Professeur LEDERER

Vous avez bien voulu juger cette thèse. Nous vous remercions de l'intérêt que vous avez bien voulu y porter et vous exprimons notre gratitude et nos sentiments très respectueux.

Monsieur le Professeur JACQUES

Nous vous sommes profondément reconnaissant d'avoir bien voulu étudier ces travaux et de siéger parmi nos Juges.
Recevez l'expression de nos remerciements et celle de notre profond respect.

Monsieur le Professeur H. H. FLOCH

Nous vous remercions du soutien que vous avez bien voulu nous apporter dans l'organisation des travaux décrits dans cette thèse et dans sa confection.
Vous avez organisé notre stage de recherches aux U. S. A. et nous accueillez au retour dans vos laboratoires de l'Ecole Nationale de Médecine de BREST.
Recevez l'expression de notre gratitude et nos souhaits d'une collaboration productive.

Monsieur le Professeur Agrégé MAUVAIS-JARVIS

Vous nous avez fait l'honneur de nous compter parmi vos élèves.
Vous nous avez fait bénéficier de vos connaissances, dans un climat d'une rare cordialité, et avez organisé notre stage de recherches aux U.S.A.
Croyez en notre reconnaissance et veuillez agréer nos sentiments respectueux.

A Monsieur le Professeur P. OFNER

Vous nous avez accueilli pendant trois années dans vos laboratoires à Boston.

Vous avez guidé nos pas dans l'atmosphère stimulante et compétitive de Harvard et aidé nos travaux de votre expérience et de vos immenses connaissances.

Vous avez stimulé notre travail par un climat de défi et par de chaudes relations, encouragé nos espoirs par de judicieuses remarques, écouté nos idées, critiqué nos erreurs, développé notre pensée.

Vous nous avez formé avec espoir, élargi nos connaissances et introduit à la Science Américaine.

Nous vous sommes reconnaissant de tout cela, et cette dédicace seule ne peut exprimer pleinement toute notre gratitude.

A Monsieur le Professeur L.L. ENGEL

En remerciement de l'intérêt qu'il nous a porté et des conseils avisés qu'il nous a prodigués.

A Monsieur le Professeur Agrégé L. BARDOU

En remerciement de l'amicale bienveillance et de l'aide qu'il nous a apporté.

A Monsieur le Docteur I. LEAV

Pour son amitié et sa collaboration pendant trois années.

A Monsieur le Docteur M. ALIAPOULIOS

Pour sa collaboration,et en souvenir de ses doigts de fée.

A Monsieur R. VENA

Amicalement, et en le remerciant de son aide précieuse.

A Madame A. SALERNO

Très amicalement, et en la remerciant des services qu'elle nous a rendus.

A Monsieur B. O'NEIL

Les dessins et figures illustrant cette thèse sont l'oeuvre de Monsieur B. O'NEIL, dessinateur médical au Lemuel Shattuck Hospital (Boston), nous le remercions de son oeuvre et de l'application qu'il y a porté.

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION	1
METHODES ET TECHNIQUES COMMUNES	8
CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE	9
Matériel utilisé	9
Systèmes de solvants utilisés	9
Visualisation des chromatogrammes	10
Quantitation des chromatogrammes	10
Elution des zones radioactives	11
FORMATION DE DERIVES	11
Oxydation	11
Acétylation	12
Préparation d'un dérivé Enol-Acétate	12
DILUTION ISOTOPIQUE ET CRISTALLISATIONS	13
BIOSYNTHESE DE STEROIDES STANDARDS ET DE SUBSTRATS RADIOACTIFS	14
Purification des stéroïdes radioactifs du commerce	15
Préparation de microsomes de foie de rat	16
Préparation de (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C	16
Préparation de Nor-19 (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C	17
Préparation de dihydroxy-3α,17β (5α) androstane-4-^{14}C	18
Préparation de dihydroxy-3β,17β (5α) androstane-4-^{14}C	18
Préparation de dihydroxy-3α,17β (5β) androstane-4-^{14}C	19
Préparation de (5α) androstanedione-4-^{14}C et d'androstérone-4-^{14}C	19
Préparation d'épiandrostérone-4-^{14}C	19
Préparation de (5β) androstanedione-3,17-4-^{14}C	20
CHAPITRE I METABOLISME *IN VIVO* DE LA TESTOSTERONE-4-^{14}C PAR LA PROSTATE ET LA VESSIE DU CHIEN	22

.../...

Page

INTRODUCTION 23

TECHNIQUE D'OPERATION DES CHIENS ET D'INJECTION DE LA TESTOSTERONE-4-^{14}C 23

EXTRACTION, PURIFICATION ET IDENTIFICATION DES RADIO-METABOLITES 24

Extraction 24

Délipidation 27

Chromatographie en couche mince des extraits purifiés 27

Analyse de radiohomogénéité par distribution à contre courant 28

RESULTATS 28

Injection de testostérone-4-^{14}C 28

Distribution des radiométabolites de la testostérone 29

La testostérone-4-^{14}C au niveau de la prostate 29

Identification des métabolites prostatiques de la testostérone-4-^{14}C 32

Métabolites polaires 32

Dihydroxy-3α,17β (5α) androstane-4-^{14}C et dihydroxy-3β,17β (5α) androstane-4-^{14}C 32

(5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C 33

Androstérone-4-^{14}C et Epiandrostérone-4-^{14}C 35

Radiométabolites possédant la mobilité chromatographique de l'androsténedione-4-^{14}C 35

(5α) androstanedione-4-^{14}C 39

Oxydations 39

Identification des stéroïdes radioactifs dans les extraits de vessie urinaire 40

Testostérone-4-^{14}C 40

Androstènedione-4-^{14}C 40

(5α) androstanedione-4-^{14}C 40

DISCUSSION DES RESULTATS 41

.../...

Page

CHAPITRE II

EFFETS DE LA CASTRATION ET D'UN ESTROGENE SUR LA STRUCTURE CELLULAIRE ET LE METABOLISME *IN VITRO* DES STEROIDES EN C_{19} DANS LA PROSTATE DU CHIEN 45

INTRODUCTION 46

OPERATION DES CHIENS 47

Biopsie 47

Castration 48

Administration d'ECP 48

HISTOLOGIE 48

Examens au microscope optique 48

Examens au microscope électronique 49

INCUBATION DES TISSUS 49

EXTRACTION ET CARACTERISATION DES METABOLITES 49

Extraction 49

Caractérisation 49

Expression des résultats 50

RESULTATS 50

Animaux intacts et animaux contrôles 52

Métabolisme de la testostérone-4-^{14}C 52

Métabolisme de l'androstènedione-4-^{14}C 53

Métabolisme de la (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C 55

Animaux traités aux estrogènes 55

Métabolisme de la testostérone-4-^{14}C 55

Métabolisme de l'androstènedione-4-^{14}C 56

Métabolisme de la (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C 56

Animaux castrés 56

Métabolisme de la testostérone-4-^{14}C 56

Métabolisme de l'androstènedione-4-^{14}C 59

Métabolisme de la (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C 59

Métabolisme prostatique des stéroïdes en $C_{19}O_2$ après traitement par l'ECP ou castration ; Utilisation de la même glande avant et après traitement 59

DISCUSSION DES RESULTATS 63

.../...

Page

CHAPITRE III

METABOLISME *IN VIVO* DE STEROIDES EN C-19 PAR L'HYPERPLASIE BENIGNE ET L'ADENOCARCINOME DE LA PROSTATE HUMAINE ET PAR LA PROSTATE DU CHIEN 71

INTRODUCTION 72

METHODES 73

Prostate humaine 73

Prostate canine 75

Extraction, purification et identification des radiométabolites 75

Extraction et délipidation 75

Purification et identification des radiométabolites 75

RESULTATS 76

Injection de testostérone-4-^{14}C : Prostate canine 76

Injection d'androstènedione-4-^{14}C : Prostate canine 76

Identification de l'épiandrostérone 77

Identification de la (5α) androstanedione 77

Hypertrophie bénigne de la prostate humaine 77

Identification de la (5α) dihydrotestostérone 78

Identification du dihydroxy-3α,17β (5α) androstane 78

Identification du dihydroxy-3β,17β (5α) androstane 80

Adénocarcinome de la prostate humaine 80

DISCUSSION DES RESULTATS 82

CHAPITRE IV

METABOLISME *IN VITRO* DES STEROIDES EN C-19 PAR DES PREPARATIONS DE PROSTATES HUMAINES ET CANINES 87

INTRODUCTION 88

METHODES 89

Collection et préparation des tissus 89

Préparation de broyats et d'homogénats 90

Préparation de fractions sub-cellulaires 90

Incubations 91

Extraction et séparation des radiométabolites 92

.../...

Page

Identification des radiométabolites 92
RESULTATS 92
HYPERTROPHIE BENIGNE DE PROSTATE HUMAINE 92
Incubation d'homogénats avec de la testostérone-4-^{14}C 92
Identité et taux des radiométabolites 92
Transformations de la testostérone à différents temps d'incubation 98
Activités enzymatiques 100
Incubation d'homogénats avec de la (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C 104
Identité et taux des radiométabolites 104
Transformation de la (5α) dihydrotestostérone à différents temps d'incubation 104
Activités enzymatiques 106
Incubation de broyats de prostate avec de la testostérone-4-^{14}C 107
Identité et taux des radiométabolites 107
Activités enzymatiques des broyats de prostate 107
PROSTATES CANINES 108
Incubation d'homogénats avec de la testostérone-4-^{14}C ou de la (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C 108
Identité et taux des radiométabolites 108
Activités enzymatiques 109
Incubation de broyats de prostate canine avec de la testostérone-4-^{14}C ou de la (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C 110
Identité et taux des radiométabolites 110
Activités enzymatiques 111
REDUCTIONS EN 3α ET EN 3β DANS LES TISSUS SEXUELS SECONDAIRES DE TROIS ESPECES 111
ACTIVITES ENZYMATIQUES DANS LES SOUS-FRACTIONS CELLULAIRES DE TISSU PROSTATIQUE HUMAIN 113
Microsomes 113
Surnageant des centrifugations 115
DISCUSSION DES RESULTATS 117

.../...

Page

CHAPITRE V

ETUDE DES METABOLITES POLAIRES DE LA TESTOSTERONE DANS LES GLANDES PERIANALES DU CHIEN 121

INTRODUCTION 122

OBTENTION ET SEPARATION DES METABOLITES POLAIRES 122

In vivo 122

In vitro 123

METHODES UTILISEES 123

Chromatographie en couche mince 123

Oxydation, acétylation, cristallisation 123

Utilisation de substrats doublement marqués 124

Spectrographie de masse 124

Synthèse de trihydroxy-3β,7α,17β (5α) androstane 125

Obtention de la (5α) androstanetrione-3,7,17 125

RESULTATS 125

Métabolites polaires de la testostérone *in vivo* 125

Métabolites polaires de la testostérone *in vitro* 126

Métabolites polaires de la (5α) dihydrotestostérone *in vitro* 128

Spectrographie de masse 128

Etalonnage 128

Mesures 129

DISCUSSION DES RESULTATS 130

CONCLUSION 132

BIBLIOGRAPHIE 136

ABREVIATIONS

Steroïdes*

(5α) ANDROSTANEDIONE = (5α) androstanedione-3,17
5α-androstane-3,17-dione

ANDROSTENEDIONE = Androstène-4 dione-3,17
4-androstene-3,17-dione

ANDROSTERONE = Hydroxy-3α (5α) androstanone-17
3α-hydroxy-5α-androstan-17-one

CHOLESTEROL = cholestén-5 ol-3β
5-cholesten-3β -ol

DEHYDROEPIANDROSTERONE = Hydroxy-3β androstén-5 one-17
3β-hydroxy-5-androsten-17-one

DIHYDROXY-3α,17β (5α) ANDROSTANE = (5α) androstanediol-3α,17β
5α-androstane-3α,17β-diol

DIHYDROXY-3β,17β (5α) ANDROSTANE = (5α) androstanediol-3β,17β
5α-androstane-3β,17β-diol

DIHYDROXY-3α,17β (5β) ANDROSTANE = (5β) androstanediol-3α,17β
5β-androstane-3α,17β-diol

(5α) DIHYDROTESTOSTERONE = Hydroxy-17β (5α) androstanone-3
17β-hydroxy-5α-androstane-3-one

ECP = Cyclopentanepropionoxy-17β estratrièn-1,
3,5 (10)ol-3
1,3,5 (10)-estratriène-3,17β-diol 17β-
cyclopentanepropionate

*EPI*ANDROSTERONE = Hydroxy-3β (5α) androstanone-17
= 3β -hydroxy-5α -androstane-17-one

ESTRADIOL 17β = Estratriène-1,3,5 (10) diol-3,17β
1,3,5 (10) estratriene-3,17β-diol

---

*Le nom proposé en premier est celui présenté dans les règles de la nomenclature (Projet 1967 de l'IUPAC:IUB).
Le nom proposé en second est celui présenté dans "IUPAC-IUB Revised Tentative Rules for Nomenclature of Steroids, Biochemistry, 8 : 2227, 1969.

.../...

NOR 19-DIHYDROTESTOSTERONE	= Hydroxy-17β estranone-3 17β-hydroxy-estrane-3-one
NOR 19-TESTOSTERONE	= Nor-19 hydroxy-17β androstén-4 one-3 19-nor-17β-hydroxy-4-androsten-3-one
TESTOSTERONE	= Hydroxy-17β androstén-4 one-3 17β-hydroxy-4-androsten-3-one
TRIHYDROXY-3β,7α,17β (5α) ANDROSTANE	= (5α) androstanetriol-3β,7α,17β 5α-androstane-3β,7α,17β-triol
ADN	= Acide désoxyribonucléique
ATP	= Adénosine triphosphate 5'
ARN	= Acide ribonucléique
DIETHYLSTILBESTROL	= Diéthyl 3,4-bis (4-hydroxyphényl-3-hexane)
NAD^+	= Nicotinamide-adénine dinucléotide forme oxydée)
NADH	= Nicotinamide-adénine dinucléotide (forme réduite)
$NADP^+$	= Nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée)
NADPH	= Nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
NEMBUTAL	= Acide 5 éthyl 5 (méthyl, 1 butyl) barbiturique
7α HYDROXYLASE	= Stéroïde-7α hydroxylase
3α OXYDOREDUCTASE	= Hydroxy-3α stéroïde : NAD (P) oxydoréductase

.../...

3β OXYDOREDUCTASE	= Hydroxy-3β stéroïde : NAD(P) oxydoréductase
17β OXYDOREDUCTASE	= Hydroxy-17β stéroïde : NAD oxydoréductase
5α REDUCTASE	= Androstèn-4,one, 5α réductase
CCM	= Chromatographie en couche mince
GLC	= Chromatographie en phase gazeuse
dpm	= désintégration par minute
cpm	= coups par minute
g	= gramme
g. eq.	= gramme équivalent
mg	= milligramme
µg	= microgramme
ml	= millilitre
M	= Molaire
µM	= Micromolaire
mmole	= millimole
µmole	= micromole
pmole	= picomole
µC	= microcurie
°C	= degré centigrade

INTRODUCTION

En 1792, John HUNTER (77) observait l'atrophie de la prostate après castration, associant *in vivo* la prostate à une fonction testiculaire normale. En 1905, STARLING (78) suggérait que les hormones sont des messagers chimiques qui coordonnent la croissance de différents tissus. Il fallait cependant attendre la découverte des stéroïdes hormonaux pour que des progrès importants puissent être faits dans ce domaine. LACASSAGNE en 1933 (78,80) et BURROWS en 1934 (81) ont défini l'action des estrogènes sur la prostate de souris.

En s'appuyant sur ces travaux, Charles HUGGINS commençait en 1940 (34,45,47) une longue série d'expériences sur le chien au terme desquelles il recevait en 1966 le prix Nobel de Médecine et de Physiologie. Bon nombre des travaux actuels sur la prostate sont basés sur ces expériences.

Après les découvertes fondamentales faites par les grands pionniers, les efforts ont porté, depuis près de 20 ans sur le métabolisme des hormones, les modalités de leur sécrétion, de leur distribution dans l'organisme et de leur inactivation.

Ainsi, à la lumière des connaissances actuelles en endocrinologie biochimique, anatomie cellulaire et biologie macromoléculaire, les mécanismes reliant la prostate normale et néoplasique à la fonction testiculaire et à d'autres influences hormonales commencent à être compris.

Les bases moléculaires de l'action des hormones sexuelles (82) et les effets morphogénétiques des androgènes sur la prostate sont analysés dans la revue de WILLIAMS-ASHMAN et de ses collaborateurs (83,84,85). Plus généralement, la biologie de la prostate a été exposée d'une façon très détaillée au cours d'un symposium en 1963 (86) et dans 2 traités (87,88).

Plus récemment,OFNER (6) publiait une revue détaillée sur les effets des métabolismes hormonaux sur la prostate normale et néoplastique, et LIAO (63) groupait dans un exposé détaillé les résultats actuels concernant le mode d'action des androgènes sur la transcription du génome dans la prostate du rat.

Les hormones stéroïdes, en faible quantité, semblent diriger ou contrôler des processus moléculaires cruciaux pour le développement et le maintien d'activités cellulaires spécifiques dans l'organisme différencié. Les processus moléculaires par lesquels les hormones stéroïdes accomplissent leur effet remarquable reste inconnu. Historiquement, l'étude des mécanismes d'action hormonaux a suivi de près d'une part les progrès de nos

.../..

connaissances sur les processus moléculaires de base mis en jeu dans l'organisme vivant, et d'autre part l'identification des métabolites de ces hormones au sein de leur tissu cible.

D'une façon générale, il était naturel que l'une des approches les plus communément employées pour l'étude des mécanismes d'action hormonaux ait été l'effet de ces hormones sur des enzymes isolées. On a cependant reproché à ces méthodes de n'être guère significatives (63) car n'étant pas physiologiques, elles ne pouvaient être ramenées à une situation *in vivo* (53).

Il est donc préférable, dans ce domaine, d'expérimenter d'abord sur des animaux sinon sur des organes entiers de façon à connaître les processus de base avant de se lancer dans des expériences *in vitro*.

La commodité des manipulations a imposé le rat pour les expériences *in vivo*.

Les expériences de PEARLMAN (22) de EL-ATAR (89) de GREER (90) et de HARDING et SAMUELS (23) ont montré que la prostate du rat intact possède un pouvoir de rétention marqué pour les androgènes et les estrogènes libres circulant dans le sang et que la concentration des hormones stéroïdes dans la prostate est inférieure à 0,1 µM (22). De ce fait, une concentration en stéroïdes inférieure à 0,1 µM devait être utilisée *in vitro* pour que les conditions puissent être considérées comme physiologiques (6).

Au cours des expériences de perfusion de l'animal entier, l'hormone radioactive perfusée était métabolisée. On ne pouvait affirmer que les radiométabolites retrouvés dans la prostate étaient formés dans ce tissu.

Par injection lente de l'hormone radioactive dans le système artériel afférent de la prostate, il devenait possible d'étudier les radiométabolites formés *in vivo* dans cette glande.

La mise à nu des artères et l'injection de l'hormone rendaient nécessaire l'utilisation d'animaux plus gros que le rat. D'autre part une prostate de taille importante devait supporter une quantité physiologique plus élevée d'hormone radioactive. L'étude de la transformation des androgènes marqués dans la prostate de chiens vivants a donc été pratiquée. ALIAPOULIOS et Collaborateurs (14) ont injecté de la testostérone dans les artères urogénitales et pudiques internes de jeunes chiens et analysé les stéroïdes radioactifs formés dans la prostate.

Ces expériences mettaient en évidence la présence de la 5α-

.../...

réductase et celle de 3α et 17β oxydoréductases dans la prostate du chien *in vivo* .

La présence de ces systèmes enzymatiques était également suggérée chez le rat par les travaux de HARDING et SAMUELS (23) et ceux de FARNSWORTH et BROWN (86, voir p.323) . Au premier abord ce genre d'expérience n'était pas réalisable sur l'homme et tout au moins ne pouvait pas devenir une méthode de routine .

Il était donc nécessaire de mettre au point *in vitro* des procédés expérimentaux sur la prostate humaine, dont les résultats puissent avoir une signification physiologique .

L'ablation chirurgicale de prostates humaines hyperplasiques est pratiquée couramment dans les hopitaux . Ces tissus ont déjà été utilisés par de nombreux auteurs . Les premières tentatives d'incubation de coupes (91,92) se sont soldées par des échecs, le rapport tissu/substrat des incubations étant trop bas . Les conditions d'incubation utilisées étant optimales pour du tissu hépatique, on pouvait en déduire que la prostate possédait une quantité moindre d'enzymes métabolisant la testostérone .

Une bonne appréciation du potentiel métabolique de la prostate humaine a pu être faite lorsque des concentrations physiologiques de substrat marqué ont été utilisées pour les incubations .

FARNSWORTH et BROWN (16), incubant de la testostérone 2,3 µM dans un rapport tissu/substrat de 15 000/1 ont identifié la (5α) androstanedione, l'androstènedione et la (5α) dihydrotestostérone parmi les métabolites formés .

CHAMBERLAIN et Collaborateurs (5), incubant de la testostérone 80 nM dans un rapport tissu/substrat de 270 000/1 en présence de NADPH ou de NAD+ & NADP+ ont identifié le dihydroxy-3α,17β(5α) androstane dont la formation est favorisée par NADPH .

Ces résultats, sous réserve d'identification formelle des radiométabolites suggéraient dans la prostate humaine la présence d'une 5α-réductase et des 3α et 17β-oxydoréductases .

De plus, ACEVEDO et GOLDZIEHER (75,76) mettaient en évidence une 2β et une 6β-hydroxylation dans ces mêmes tissus incubés avec de l'androstènedione 60 µM (2 330/1) en présence d'ATP, de NAD+ & NADP+, et d'acide fumarique .

D'un autre côté, FARNSWORTH (93,94) soulevait la question d'une déméthylation en 10 de la testostérone . Incubant de la testostérone tritiée

dans un rapport tissu/substrat très élevé (7 000 000/1), il mettait en évidence de la 19-nor (5α) dihydrotestostérone. Parmi les métabolites formés, 35 % correspondaient à des composés phénoliques, 10 % pouvant être assimilés à de la 2-méthoxyestrone. Aucun des estrogènes classiques ne pouvaient être mis en évidence. Ces travaux n'ont pas été confirmés malgré un essai de CHAMBERLAIN (95).

La présence de 19-nortestostérone aurait cependant pu étayer la suggestion de SEGALOFF (110) selon qui la 19-nortestostérone serait le métabolite actif au niveau de l'organe cible, la testostérone n'en étant que le précurseur.

Cette supposition était basée sur les activités androgéniques élevées montrées par des dérivés de la 19-nortestostérone (96).

D'une façon générale, les études du métabolisme des androgènes *in vitro* ont démontré la présence d'enzymes transformant la testostérone en composés réduits possédant une activité androgénique plus importante que l'hormone mâle (24,86).

L'importance de ce métabolisme réductif a été soulignée par les travaux de MAUVAIS-JARVIS *in vivo* sur l'homme. BAULIEU et MAUVAIS-JARVIS (33) ont mis en évidence que la différenciation sexuelle chez le mâle correspondait à la conservation de l'hydroxyle en 17β au cours des réductions successives de la testostérone dans les organes cibles. D'autre part (31) pour les sujets mâles souffrant du syndrôme du testicule féminisant, les productions hormonales par les testicules étaient normales, bien que la différenciation sexuelle soit de type féminin. Dans les organes cibles de ces sujets, la testostérone radioactive était transformée selon une voie métabolique oxydative caractérisée par l'apparition de stéroïdes 17-cétoniques dans les urines.

Ainsi, le métabolisme réductif de la testostérone dans l'organe cible pourrait avoir une relation directe avec les mécanismes d'action des androgènes *in vivo*.

Plusieurs idées directrices se dégagent des travaux qui viennent d'être discutés : des conditions physiologiques sont préconisées. Etudiées et décrites au cours d'expériences *in vivo* elles peuvent être appliquées aux expériences *in vitro*.

Une connaissance parfaite du métabolisme hormonal dans la cellule de l'organe cible semble nécessaire à l'interprétation et à l'étude des

.../...

processus moléculaires induits par l'hormone.

Le but des expériences *in vivo* et *in vitro* est précisément la caractérisation des voies métaboliques de la testostérone radioactive. Certaines enzymes impliquées dans les transformations de la testostérone sont caractérisées par simple identification des métabolites de cette hormone. Des études plus détaillées doivent permettre d'isoler ces enzymes et de caractériser les cofacteurs qui leur sont nécessaires.

Des tests biologiques, tels que la culture d'organe (13,25,97,98) permettent de mettre en évidence ceux des métabolites qui ont une activité androgénique.

Dans des conditions physiologiques, les expériences *in vitro* ont une importance primordiale car les prostates humaines ne peuvent généralement être étudiées que par ces méthodes. L'hypertrophie bénigne et l'adénocarcinome de la prostate humaine sont, somme toute, le but réel de la plupart de ces recherches. Il en découle que les études faites sur les animaux précédent ce qui sera tenté sur l'homme.

Le rat, par excellence est l'animal le plus utilisé. D'autre part, le chien est l'animal modèle le plus remarquable, surtout à cause de sa pathologie prostatique similaire à celle de l'homme (6).

Au cours de ces trois dernières années, forts de ces connaissances déjà acquises, notre contribution personnelle s'est dispersée dans tous ces domaines.

D'une manière générale, nous avons étudié le métabolisme de la testostérone dans la prostate chez l'homme et chez le chien, *in vivo* et *in vitro*.

Les procédés mis en oeuvre *in vivo* ont permis une irrigation directe de la prostate par des hormones radioactives. Les métabolismes hormonaux, chez l'homme et chez le chien ont été comparés.

Nous avons poursuivi *in vitro* les études de ces métabolismes. L'utilisation comme substrats de certains des métabolites, et l'étude des cinétiques enzymatiques ont permis d'établir les voies métaboliques et de comparer les activités enzymatiques dans un même tissu ou celles présentes dans des tissus différents.

Nous avons appliqué ces méthodes *in vitro* à l'étude des modifications du métabolisme hormonal dans la prostate du chien après traitement de l'animal par un estrogène, ou bien après castration.

.../...

L'interprétation des résultats obtenus a permis d'avancer certaines hypothèses.

Ces travaux ont contribué à la connaissance du métabolisme hormonal dans la prostate. Les éléments nouveaux qu'ils apportent doivent contribuer à la recherche des mécanismes d'action des androgènes au niveau des organes cibles et permettre de progresser dans une meilleure connaissance de l'hypertrophie et du cancer de la prostate humaine.

.../...

METHODES ET TECHNIQUES COMMUNES

I - CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

La chromatographie en couche mince (CCM) a été introduite à différents niveaux de l'expérimentation. Elle a été utilisée à l'échelle préparative pour la purification de stéroïdes du commerce ou de produits de réaction chimique, et surtout à l'échelle analytique pour la séparation et l'identification de stéroïdes radioactifs obtenus après manipulations biologiques.

a) *Matériel utilisé*

Les couches minces de gel de Silice G (Merck), de gel de Silice GF_{254} (Merck), et d'alumine G (Merck) étaient produites sur plaques de verre à l'aide soit d'un applicateur Desaga, soit d'un applicateur Brinkmann.

Les solvants utilisés pour le développement des plaques étaient distillés, et les échantillons appliqués sur les plaques à l'aide d'un tube capillaire de verre puis séchés sous un courant d'azote.

A l'échelle préparative des plaques de 40 x 20 cm ont permis de traiter des quantités de stéroïdes variant entre 20 et 30 mg. Ces plaques étaient développées "en sandwich" d'une manière ascendante.

A l'échelle analytique, de 4 à 8 échantillons différents pouvaient être appliqués puis développés sur une plaque de 20 x 20 cm. Ces plaques étaient développées soit dans une direction ascendante dans des cuves de verre non saturées de solvants, soit dans une direction horizontale et d'une façon continue dans une cuve BN (Desaga).

b) *Systèmes de solvants utilisés*

N°1 chloroforme/éthanol (9 : 1); 2 fois, n°2 benzène/éthanol (9 : 1); 2 fois, n°3 benzène/acétate d'éthyle (1 : 4); 2 fois, n°4 cyclohexane/acétate d'éthyle (4 : 6) pendant 5 h. en continu, n°5 benzène/éthanol (97 : 3) ; 1 fois, n°6 chloroforme/éther (9 : 1); 1 fois, n°7 chlorure de méthylène/ éther (9 : 1); 2 fois, n°8 chloroforme/éther (7 : 3); 1 fois, n°9 n-hexane/ acétate d'éthyle (5 : 1); 2 fois.

Les systèmes indiqués ci-dessus sont classés, en regard avec les stéroïdes qu'ils entraînent, dans un ordre de polarité décroissante.

Les plaques soumises aux systèmes n°5 à 9 étaient auparavant développées sur 2 cm environ avec de l'éther de façon à concentrer les échantillons sur une mince ligne de départ.

.../...

c) *Visualisation des chromatogrammes*

Après évaporation de l'excés de solvants, la révélation des plaques se faisait par pulvérisation d'une solution d'acide sulfurique et d'éthanol (1 : 1 , v/v) puis chauffage dans une étuve à 110°C jusqu'à ce que l'intensité des taches obtenues soit satisfaisante. Par la suite, l'estompage de ces taches pouvait être empêché en couvrant les chromatogrammes avec une plaque de verre propre (1).

Lors de travaux avec des stéroïdes marqués au carbone 14, la visualisation des chromatogrammes se faisait par autoradiographie de ces derniers.

Après évaporation de l'excès de solvants, les plaques développées étaient marquées aux coins par des tâches d'une solution éthalonique de Soudan III contenant une quantité suffisante d'un stéroïde radioactif du commerce. Ceci permettait par la suite d'aligner très exactement le film sur la plaque.

Les plaques ainsi marquées étaient placées dans une boîte étanche, en contact intime avec un film pour rayons X (Kodak BB-54). Ce film développé au bout d'une période variant de 48 à 120 heures selon la quantité de radioactivité présente sur la plaque permettait de localiser très précisément sur celle-ci l'emplacement des composés radioactifs recherchés. En outre cette méthode évitait la dénaturation des stéroïdes présents sur la plaque et permettait de conserver une copie très exacte de celle-ci.

d) *Quantitation des chromatogrammes*

Après l'obtention d'un autoradiogramme, le film était placé très exactement sur la plaque correspondante et les taches dues à la radioactivité marquées sur leur pourtour par pression sur le film avec une pointe. Les zones de gel ainsi déterminées pouvaient être grattées avec une lame de rasoir, et récupérées dans des fioles de comptage en scintillation liquide.

Le gel contenu dans chaque fiole pouvait être ensuite soit directement compté , soit soumis à d'autres étapes de purification ou d'analyse.

Lorsque la radioactivité était estimée insuffisante pour l'obtention d'un autoradiogramme (1000-1500 dpm), l'échantillon radioactif était additionné à des quantité de 5 à 10 µg de stéroïdes connus non radioactifs. La plaque développée était ensuite révéléee par pulvérisation d'acide sulfurique éthanolique (1 : 1 v/v) et les zones colorées comptées directement après collection dans des fioles de comptage en scintillation liquide.

.../...

La quantitation était effectuée par comptage en scintillation liquide au moyen d'un spectromètre pour scintillation liquide Packard Tri-Carb, ou d'un compteur en scintillation liquide Beckman, modèle L-250. La mesure du quenching était faite automatiquement sur ce dernier par comptage d'un étalon externe, et sa correction par augmentation proportionnelle du gain lors du comptage d'échantillons doublement marqués au tritium et au carbone 14 (Automatic Quench Correction).

On permettait sur ces deux appareils l'accumulation suffisante d'impulsions radioactives au compteur de façon à ce que l'erreur sur les coups par minute (cpm) n'exède pas 2 %.

Les cpm obtenus étaient par la suite convertis en désintégrations par minute (dpm) en se basant sur l'efficacité au comptage d'une fiole standard de la molécule marquée utilisée pour l'expérience, et en tenant compte du degré de quenching. Des expériences de contrôle ont montré que la silice G traitée à l'acide sulfurique présente 10 à 20 % de quenching, le gel non traité par contre n'en présente que 3 à 5 %.

e) *Elution des zones radioactives*

Les composés radioactifs jugés intéressants étaient immédiatement élués de leur gel. La zone de gel, transférée dans une fiole était recouverte d'un solvant : Acétate d'éthyle ou chloroforme pour les composés non polaires, méthanol ou un mélange de méthanol et d'acétate d'éthyle pour les composés polaires.

Le gel et le solvant étaient ensuite versés sur un filtre de verre fritté, et rincé plusieurs fois avec le même solvant. Le filtrat recueilli contenait plus de 99 % de la radioactivité soumise à l'élution pour les composés non polaires, et de 95 à 98 % de la radioactivité initiale pour les composés polaires. Ces solutions étaient ensuite concentrées à 40°C sous un courant d'azote. Les composés radioactifs ainsi isolés pouvaient être par la suite analysés avec un autre système chromatographique, utilisés pour la formation de dérivés, ou bien leur radiohomongénéité prouvée par dilution isotopique et cristallisation à activité spécifique constante.

II - FORMATION DE DERIVES

a) *oxydation*

L'oxydation chromique de stéroïdes radioactifs en quantité inférieure au microgramme a nécessité une modification de la méthode proposée par DJERASSI (2). L'ensemble des manipulations a été conduit à 0°C sur

.../...

glace pilée.

L'échantillon radioactif dissous dans 1 ml d'acétone était mis en contact avec trois gouttes du réactif au trioxyde chromique pour une durée de 10 minutes.

La majeure partie de l'acétone évaporée par un fort courant d'azote, était remplacée rapidement par 5 ml d'eau glacée, et les produits de l'oxydation extraits de la phase aqueuse par de l'acétate d'éthyle.Cette solution lavée successivement par de la soude à 0,2 % et de l'eau était concentrée à 40°C sous un courant d'azote.

La séparation des différents produits oxydés était ensuite généralement obtenue par CCM sur silice G dans le sytème n°6 ou 8.

b) *acétylation*

Les échantillons (jusqu'à 20 mg) dissous dans 1 ml de pyridine étaient traités individuellement pendant 18 heures avec 1 ml d'anhydride acétique.

Après addition de méthanol (2 ml), les solvants volatils étaient évaporés par un fort courant d'azote et les produits acétylés solubilisés avec du chloroforme. La solution chloroformique lavée d'abord avec de la soude à 0,5 % puis avec de l'eau, était ensuite concentrée à 50°C sous un fort courant d'azote. La séparation des différents acétates était généralement obtenue par CCM sur silice G dans le système n°8 ou 9.

c) *Préparation d'un dérivé Enol-acétate : le diacétoxy-3 ,17β (5α) androstène-2*

L'énol-acétylation de stéroïdes cétoniques saturés par la méthode de BARTON (3) a été adaptée à la préparation du dérivé Enol-diacétate de la (5α) dihydrotestostérone en quantités de l'ordre du milligramme.

Le mélange des réactifs était effectué à 0°C sur de la glace pilée. Un mélange d'acide perchlorique à 50 % et d'anhydride acétique, dans les proportions de 3 : 107 (v/v) constituait le réactif pour énol-acétylation.

Ce réactif (0,1 ml) était ajouté à 1 ml d'une solution glacée d'acétoxy-17β (5α) androstanone-3 dans du tétrachlorure de carbone.

Ce mélange conservé pendant 2 heures dans l'obscurité et à température ambiante, recevait ensuite une addition de 3 ml de méthanol glacé, puis 8 ml de chloroforme. Les acides étaient lavés de la solution organique par de la soude à 0,5 % puis par de l'eau.

.../...

L'énol-diacétate obtenu était ensuite purifié par CCM sur silice G avec un triple développement dans le système n°9.

Le dérivé pur obtenu avec un rendement de 48,5 à 64,5 % et recristallisé (éther/n-hexane) avait un point de fusion de 173-174,5°C.

III - DILUTION ISOTOPIQUE ET CRISTALLISATION A ACTIVITE SPECIFIQUE CONSTANTE

L'identité de certains composés radioactifs provenant des manipulations biologiques a été prouvée par cristallisation à activité spécifique constante après dilution isotopique.

Les stéroïdes authentiques non radioactifs utilisés pour la dilution isotopique ont été contrôlés par chromatographie en phase gazeuse, et selon la nécessité purifiés par CCM préparative.

Le poids de stéroïde authentique ajouté au composé radioactif était obtenu par pesage direct sur une microbalance Mettler en observant les précautions décrites par AXELROD (14). La radioactivité présente dans chaque échantillon était déterminée par comptage d'une partie aliquote suffisamment importante pour que l'erreur de comptage après 100 minutes soit inférieure à 2 %.

Après chaque cristallisation le poids des cristaux et celui des eaux-mères était déterminé par chromatographie en phase gazeuse (chromatographe Jarrel Ash, modèle 28-700, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme) en utilisant les mesures de hauteur des pics et les formules suivantes :

$$\text{Poids des cristaux} = \frac{R' \cdot P \cdot Hc}{R \cdot (Hc + Hm)}$$

$$\text{Poids des eaux-mères} = \frac{R' \cdot P \cdot Hm}{R \cdot (Hc + Hm)}$$

où :

R = radioactivité initiale soumise à la cristallisation

R' = radioactivité totale contenue dans les cristaux et les eaux-mères

P = poids initial soumis à la cristallisation

Hc = hauteur du pic obtenu par chromatographie en phase gazeuse pour une aliquote A des cristaux.

Hm = hauteur du pic obtenu en chromatographie en phase gazeuse pour une aliquote A des eaux-mères

.../...

La hauteur des pics utilisée était une moyenne de plusieurs mesures consécutives de la même aliquote, tant pour les cristaux que pour les eaux-mères.

Entre plusieurs mesures consécutives, les variations observées étaient de l'ordre de ± 2 %. Le temps de rétention du stéroïde sur la colonne était réglé initialement par variation de la pression du gaz vecteur de façon à ce que les pics obtenus soient suffisamment éloignés de l'origine du chromatogramme et linéairement proportionnels. Pour plus de sûreté on tachait d'obtenir des hauteurs de pics voisines pour les cristaux et les eaux-mères en modifiant le volume de la partie aliquote prélevée sur l'un ou l'autre. Cette modification était corrigée ensuite par l'introduction d'un facteur de correction dans la formule.

L'avantage de cette méthode est qu'elle élimine l'emploi d'un étalon externe tel que le décrit CHAMBERLAIN (5) et dont la possible concentration peut amener des résultats embarassants. Elle réduit aussi considérablement le temps pris par la chromatographie en phase gazeuse car elle élimine les injections de contrôle de cet étalon externe.

D'autre part, dans les limites de sensibilité et de reproductibilité de l'appareil elle permet de travailler sur des solutions de cristaux davantage diluées et dont le volume des parties aliquotes peut être mesuré plus précisément. De ce fait trois cristallisations consécutives de 3 ou 4 milligrammes d'un stéroïde contenant 3000 à 3500 dpm pouvaient être effectuées.

Après plusieurs cristallisations, on considérait l'activité spécifique comme étant constante lorsque celle des dernières eaux-mères et celle des deux derniers cristaux ne différaient pas de plus de 5 %.

IV - BIOSYNTHESE DE STEROIDES STANDARDS ET DE SUBSTRATS RADIOACTIFS

Une gamme de stéroïdes standards radioactifs s'est révélée nécessaire pour les chromatographies en couche mince. Ces standards radioactifs, utilisés comme références devaient d'une part permettre sur l'autoradiogramme et sur la plaque une préidentification des composés radioactifs obtenus à partir des extraits analysés, et d'autre part suivre ces composés dans les différents tests d'identification.

D'un autre côté, les recherches effectuées sur le catabolisme de la testostérone dans les organes cibles ont démontré la nécessité de travailler *in vivo* avec des quantités physiologiques d'hormone, et

.../...

in vitro avec un rapport tissu/substrat élevé (6). Ces expériences n'ont pu être effectuées qu'avec les stéroïdes radioactifs du commerce (Testostérone, Androstènedione).

L'utilisation comme substrats de certains des métabolites de la testostérone ouvrait un nouvel aspect de recherches sur les enzymes métabolisant cette hormone.

Déjà, BRUCHOVSKY et WILSON (7) ont préparé de la (5α) dihydrotestostérone tritiés par incubation de testostérone-1-2-^{3}H avec des noyaux de prostate de rat. Plus récemment MAUVAIS-JARVIS (8) a étudié le métabolisme du dihydroxy-3β,17β (5α) androstane-1-2-^{3}H, synthétisant ce dernier par voie organique à partir de testostérone-1-2-^{3}H.

Notre expérience dans la biosynthèse de stéroïdes radioactifs (9) nous a permis d'utiliser comme source d'enzymes des sous-fractions cellulaires de foie de rats. Les microsomes hépatiques provenant d'une femelle ont été utilisés comme source de 5α-réductase et de 3α-oxydoréductase, alors que ceux provenant d'un mâle étaient utilisés comme source de 3β-oxydoréductase.

Le surnageant obtenu lors des préparations sur foie de rat mâle était utilisé comme source de 5β-réductase. L'incubation de stéroïdes radioactifs du commerce avec ces fractions, en présence de NADPH, a permis la préparation d'une gamme de stéroïdes radioactifs.

L'identité de chacun des stéroïdes préparé a ensuite été prouvée par dilution isotopique et cristallisation à activité spécifique constante.

a) *Purification des stéroïdes radioactifs du commerce*

La testostérone-4-^{14}C (58,8 µC/ µmole), l'androstènedione-4-^{14}C (50,7 µC/µmole) et la Nor-19 testostérone (50,3 µC/µmole) de New England Nuclear Corporation étaient purifiées avant leur emploi pour des manipulations biologiques.

La préparation commerciale était appliquée sur une couche mince de silice GF_{254} qui avait été auparavant lavée à l'éthanol. Après développement dans le système n°8, la chromatographie était autoradiographiée et la forte zone radioactive correspondant à celle visible sur la plaque sous éclairage ultra-violet était grattée et éluée. Le poids de stéroïde recueilli et sa dilution dans l'éluat étaient déterminés d'après l'activité spécifique initiale.

.../...

b) *Préparation de microsomes de foie de rat*

Des femelles adultes, de race Sprague-Dawley, pesant entre 200 et 250 g étaient assommées et décapitées. Les foies, prélevés rapidement et lavés dans du sérum physiologique à 4°C étaient transportés en chambre froide où ils étaient égouttés sur de la gaze hydrophile. Les foies coupés en morceaux et traités dans une presse à main étaient ensuite homogénéisés dans un appareil verre-téflon en présence de trois fois leur poids en volume d'un tampon phosphate KH_2PO_4-Na_2HPO_4 0,067 M, pH 7,4) contenant du saccharose 0,25 M.

Le fractionnement de l'homogénat se faisait par centrifugation différencielle : à 900 g pendant 10 minutes, à 13 500 g pendant 10 minutes et à 105 000 g pendant 30 minutes, dans une ultracentrifugeuse Beckman L 50.

Le culot obtenu à la dernière centrifugation était remis en suspension dans le même tampon froid et resédimenté à la même vitesse pendant 30 minutes. Ce dernier culot constituait la préparation de microsomes et était remis en suspension dans un volume de tampon sans saccharose suffisant pour donner une concentration équivalente à 1 g de tissu frais par 3 ml.

A l'essai du Biuret cette préparation contenait de 20 à 30 mg de protéines par gramme de tissu hépatique.

Une préparation identique en tout point était effectuée pour les foies de râts mâles de la même race. Dans ces cas là, en sus de la préparation de microsomes, le dernier surnageant obtenu après centrifugation à 10 500 g était conservé et contenait à l'essai du biuret de 40 à 51 mg de protéines par gramme de tissu hépatique.

c) *Préparation de (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C*

De la testostérone-4-^{14}C (2,45 C, 10^{-5}M) était incubée dans 5 ml de tampon phosphate (0,067 M, pH 7,4) pendant 7,5 minutes à 37°C avec une suspension de microsomes hépatiques provenant d'une femelle (2,5 mg de protéines) et en présence de NADPH (2,0 mg).

Le volume de solvant contenant la testostérone-4-^{14}C purifiée était évaporé sous azote au fond d'un tube de verre dans lequel était ajouté le tampon phosphate et la solution fraîche de NADPH dans le même tampon. Ensuite seulement était pipetée la quantité voulue de supension de microsomes avant de commencer l'incubation.

.../....

Au bout de 7,5 minutes, l'addition de 10 ml d'acétate d'éthyle suivie d'une agitation vigoureuse arrêtait la réaction enzymatique. Le tube était ensuite conservé à -18°C dans un congélateur. A la sortie du congélateur, la couche surnageante d'acétate d'éthyle pouvait être aspirée sans difficulté. La couche aqueuse glacée se liquéfiait ensuite dans le tube à température ambiante et était extraite 2 fois consécutivement par 10 ml d'acétate d'éthyle.

Les trois extraits réunis étaient concentrés à 40°C sous un courant d'azote et le petit volume obtenu chromatographié sur silice G dans le système n°8. Après autoradiographie de la plaque, une zone radioactive intense possédant le Rf de la (5α) dihydrotestostérone était localisée sur la plaque. Cette zone correspondait à 75-85 % de la radioactivité totale mesurée sur la plaque. Ce gel radioactif était récupéré et élué plusieurs fois avec de l'acétate d'éthyle.

L'éluat concentré était soumis à la CCM sur alumine dans le système n°7 afin de purifier la (5α) dihydrotestostérone en la séparant de contaminants tels que l'androstérone et l'épiandrostérone. La zone radioactive coincidant avec la (5α) dihydrotestostérone standard était ensuite éluée du gel et cristallisée à activité spécifique constante après addition de (5α) dihydrotestostérone pure non radioactive. Deux cristallisations ont permis d'atteindre une activité spécifique constante (voir tableau 1).

d) *Préparation de la nor-19 (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C*

De la nor-19 testostérone-4-^{14}C du commerce, purifiée (2,57 µC, 10^{-5}M) était incubée dans 5 ml de tampon phosphate (0,067 M, pH 7,4) pendant 5 minutes à 37°C avec une suspension de microsomes hépatiques provenant d'une femelle (2,5 mg de protéines) et en présence de NADPH) 2,0 mg).

Les incubations et les procédés d'extraction étaient conduits d'une façon exactement identique à celle décrite pour la préparation de la (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C. Après chromatographie sur silice G avec le système 8, 73 % de la radioactivité extraite était retrouvée au niveau de la nor-19 (5α) dihydrotestostérone standard.

Après chromatographie de cette zone radioactive sur alumine G dans le système n°7, la nor-19 (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C séparée d'une quantité minime d'impuretés était éluée.

.../...

Une partie de cet éluat était ajoutée à 98,8 µmoles de nor-19 (5α) dihydrotestostérone pure non radioactive préparée par la méthode de BOWERS (10) (point de fusion = 97-98°C).

Deux cristallisations ont permis d'atteindre une activité spécifique constante (voir tableau 1).

e) *Préparation de dihydroxy-3α,17β (5α) androstane-4-^{14}C*

A la suite d'incubations de testostérone-4-^{14}C avec des microsomes de foie de rat femelle pour l'obtention de (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C (voir plus haut), l'extrait chromatographié dans le sytème n°8 sur silice G était la source de dihydroxy-3α,17β (5α) androstane-4-^{14}C.

D'après l'autoradiogramme, une zone radioactive possédant le Rf des (5α) androstanediols pouvait être localisée sur la plaque.

Cette zone correspondait à 10-20 % de la radioactivité totale mesurée sur la plaque. Le gel de cette zone était récupéré et élué plusieurs fois avec un mélange d'acétate d'éthyle et de méthanol (4 : 1). L'éluat concentré était soumis à la CCM sur alumine dans le système n°5 afin de séparer le dihydroxy-3α,17β (5α) androstane-4-^{14}C de son épimère en 3β.

La zone radioactive coincidant avec le dihydroxy-3α,17β (5α) androstane-4-^{14}C standard était ensuite éluée de l'alumine et cristallisée à activité spécifique constante après addition de produit pur non radioactif (113,4 µmoles).

Deux cristallisations de ce composé ont permis d'atteindre une activité spécifique constante (voir tableau 1).

f) *Préparation de dihydroxy-3β,17β (5α) androstane-4-^{14}C*

Un extrait contenant du dihydroxy-3β,17β (5α) androstane-4-^{14}C était obtenu par incubation de (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C avec une préparation fraîche de microsomes de foie de rat mâle.

La (5α) dihydrotestostérone radioactive préparée selon la méthode décrite ci-dessus était incubée dans un volume total de 5 ml (10^{-5}M) de tampon phosphate (0,067 M, pH 7,4) pendant 3 minutes à 37°C avec 2,5 mg de protéines de la suspension microsomiale, et en présence de NADPH (2,0 mg).

Les incubations et les procédés d'extraction étaient conduits d'une façon exactement identique à celle décrite pour la préparation de la (5α) dihydrotestostérone, et les étapes de purification par deux CCM successives identiques à celles décrites pour la préparation du dihydroxy-3α,17β

.../...

(5α) androstane-4-^{14}C.

La solution purifiéee du diol radioactif obtenu était ensuite additionnée de dihydroxy-3β,17β (5α) androstane pur (152,0 µmoles), et ce mélange cristallisé à activité spécifique constante. Deux cristallisations ont été nécessaire pour atteindre une activité spécifique constante (voir tableau 1).

g) *Préparation de dihydroxy-3α,17β (5β) androstane-4-^{14}C*

Ce diol radioactif a été obtenu après incubation de testostérone 4-^{14}C avec le surnageant à 105 000 g obtenu lors de la préparation de microsomes hépatiques de rat mâle. La testostérone (10^{-5}M) était mise dans 5 ml de tampon, pendant 10 minutes, à 37°C, en présence de 25,3 mg de protéines de ce surnageant et de 2 mg de NADPH. Les radiométabolites extraits étaient séparés d'une façon identique à celle employée pour le dihydroxy-3α,17β (5α) androstane-4-^{14}C (voir plus haut).

Le dihydroxy-3α,17β (5β) androstane-4-^{14}C obtenu (rendement d'environ 10 %) était additionné du même composé non radioactif (107,5µ moles), et le mélange cristallisé à activité spécifique constante. Deux cristallisations ont été nécessaire (voir tableau 1).

h) *Préparation de (5α) androstanedione-4-^{14}C et d'androstérone-4-^{14}C*

Ces deux composés étaient obtenus par incubation d'androstènedione-4-^{14}C du commerce dans 5 ml (10^{-5}M) de tampon phosphate (0,067 M, pH 7,4) avec 1,5 mg de protéines d'une préparation de microsomes hépatiques de rat femelle, pendant 10 minutes et en présence de NADPH (2,0 mg).

Respectivement 60 et 15 % de la radioactivité extraite correspondaient sur les chromatogrammes à la (5α) androstanedione, et à l'androstérone. Seule la zone correspondant à ce dernier était rechromatographiée sur alumine G dans le système n°7 afin d'éliminer l'épimère en 3β. La (5α) androstanedione-4-^{14}C et l'androstérone-4-^{14}C préparées ont été identifiéess par cristallisation à activité spécifique constante après addition des composés non radioactifs authentiques : 69,5 µmoles pour le premier, 86,2 µ moles pour le second. Respectivement deux et trois cristallisations ont été nécessaire (voir tableau 1).

i) *Préparation d'épiandrostérone-4-^{14}C*

Cette préparation a été effectuée par incubation d'une préparation de microsomes de foie de rat mâle avec de la (5α) androstanedione

.../...

radioactive préparée comme décrit plus haut.

Une solution 10^{-5}M de ce substrat dans du tampon phosphate (0,067 M, pH 7,4) était mise en présence de 12,5 mg de protéines de la préparation microsomiale et de 2,0 mg de NADPH pendant 3 minutes.

Après extraction des métabolites radioactifs, l'épiandrostérone-4 ^{14}C était purifiée par deux CCM successives, l'une sur silice G dans le système n°8, l'autre sur alumine G dans le système n°7.

La zone correspondant à l'épiandrostérone était isolée sur ce dernier chromatogramme et éluée. Après addition du composé non radioactif (69,0 µmoles) à activité spécifique constante. Quatre cristallisations ont été nécessaire (voir tableau 1).

j) *Préparation de (5β) androstanedione-3,17-4-^{14}C*

Le (5β) androstanediol-3α,17β radioactif préparé a été utilisé pour la préparation de (5β) androstanedione-3,17. Le diol radioactif était oxydé par le réactif trichromique et le produit d'oxydation isolé selon la méthode décrite.

.../...

STEROIDE	ACTIVITE SPECIFIQUE (dpm/µmole)		CRISTALLISATIONS 1ère	2éme	3éme	4éme
(5α) dihydrotestostérone	20 400	eaux-mères	(1) 21 600	(2) 21 500	-	-
		cristaux	21 400	21 200	-	-
Nor-19 (5α) dihydrotestostérone	12 490	eaux-mères	(1) 12 270	(2) 12 950	-	-
		cristaux	12 670	12 190	-	-
Dihydroxy-3α,17β (5α) androstane	5 430	eaux-mères	(2) 5 570	(1) 5 290	-	-
		cristaux	5 300	5 310	-	-
Dihydroxy-3β,17β (5α) androstane	970	eaux-mères	(2) 952	(4) 995	-	-
		cristaux	988	985	-	-
Dihydroxy-3α,17β (5β) androstane	1 248	eaux-mères	(3) 1 330	(5) 1 168	-	-
		cristaux	1 175	1 148	-	-
(5α) androstanedione	10 180	eaux-mères	(1) 10 680	(2) 11 810	-	-
		cristaux	11 580	11 360	-	-
Androstérone	9 520	eaux-mères	(1) 9 400	(2) 10 800	(3) 8 740	-
		cristaux	9 640	9 070	9 650	-
Epiandrostérone	1 335	eaux-mères	(1) 1 360	(2) 1 470	(3) 1 595	(5) 1 140
		cristaux	1 300	1 290	1 115	1 085

Tableau I : Cristallisation à activité spécifique constante des stéroïdes radioactifs biosynthétisés

Les chiffres entre parenthèses indiquent les systèmes de solvants utilisés pour les cristallisations : (1) Acétate d'éthyle/n-hexane, (2) Acétone/n-hexane, (3) Acétone/eau, (4) Ether/n-hexane, (5) Méthanol/eau. Une activité spécifique constante était atteinte lorsque l'activité spécifique des dernières eaux-mères était identique, à 5 % près, à celle des derniers cristaux, et que celle des cristaux n'avait pas varié de plus de 5 % au cours de 2 cristallisations consécutives.

CHAPITRE I

METABOLISME *IN VIVO* DE LA TESTOSTERONE-4-^{14}C PAR LA PROSTATE ET LA VESSIE DU CHIEN

INTRODUCTION

Comme l'homme, le chien présente une tendance à développer des hyperplasies bénignes et des adénocarcinomes de la prostate. Chez les deux espèces ces tendances sont fonction de l'âge (6,11).

Si l'on veut utiliser le chien comme animal modèle pour l'étude des effets hormonaux dans la prostate humaine, il faut entre autre chose, effectuer une comparaison détaillée du métabolisme de ces hormones stéroïdes dans la prostate de chacune des deux espèces.

De récents travaux suggèrent en effet que la réponse des organes sexuels secondaires aux stimuli hormonaux est spécifiquement le fait de métabolites de ces hormones stéroïdes, produits par l'organe cible lui-même (7,13,27).

Des études *in vitro* sur le métabolisme de la testostérone par la prostate du chien (14,15,35,36) ont présenté des résultats similaires à ceux obtenus avec des préparations d'hyperplasie bénigne de prostate humaine (5,16,17).

Nous avons étudié le devenir de la testostérone-4-^{14}C injectée dans les artères afférentes de la prostate et de la vessie du chien.

Ces deux tissus ont une origine embryonnaire commune ; nos résultats ont mis en évidence chez l'un et chez l'autre des voies métaboliques de la testostérone totalement différentes. Ces différences peuvent être imputées aux différenciations qui prennent place entre ces deux tissus au cours de l'embryogénèse.

Les travaux et résultats présentés dans ce chapitre ont été publiés dans la revue "Endocrinology" : (Metabolism of testosterone-4-^{14}C by canine prostate and urinary bladder *in vivo*, R.F. MORFIN, M.A. ALIAPOULIOS, J. CHAMBERLAIN and P. OFNER. Endocrinology 87 : 394 , 1970).

TECHNIQUES D'OPERATION DES CHIENS ET D'INJECTION DE LA TESTOSTERONE-4-^{14}C

Cinq chiens bâtards mâles ont subi une anesthésie générale par injection intraveineuse de Nembutal (30 mg par Kg).

Sur la peau abdominale mise à nu une incision longitudinale était pratiquée. Après rétraction des viscères le péritoine postérieur était incisé au niveau de l'origine aortique des branches artérielles iliaques

.../...

externes, et les artères ombilicales et ilio-lombaires ligaturées.

Les deux premiers chiens utilisés ont subi l'injection de l'hormone radioactive dans l'aorte terminale, à proximité immédiate des artères iliaques internes. Dans ces deux cas l'artère sacrée médiane n'était pas ligaturée.

Les trois chiens utilisés par la suite ont subi l'injection de testostérone-4-^{14}C selon une approche différente (figure 1). Un cathéter en téflon était placé et ligaturé dans l'artère sacrée médiane de façon à ce que son extrémité se trouve au niveau de la branche des artères iliaques internes.

La testostérone radioactive solubilisée dans du sérum physiologique était injectée manuellement dans le cathéter et était entraînée par le courant sanguin dans les deux branches artérielles iliaques internes puis dans les artères génito-vésicales qui irriguent la prostate et la vessie.

Une portion importante de la radioactivité injectée était perdue dans les artères fessières et pudiques internes qui ne pouvaient être ligaturées. De façon à réduire la remise en circulation de l'hormone radioactive, les veines iliaques ont été ligaturées chez les deux premiers chiens, et la veine cave inférieure chez les trois autres. Pour ces trois derniers chiens, un cathéter inséré dans la veine cave au-dessous de la ligature permettait de collecter des échantillons de sang au cours de l'injection.

Après la perfusion, les animaux étaient sacrifiés par injection intraveineuse d'une dose léthale du même barbiturique. La prostate, la vessie et le foie étaient alors immédiatement prélevés et pesés (voir tableau 2).

La radioactivité contaminant la verrerie utilisée et le tube de téflon était extraite avec de l'éthanol et déterminée.

EXTRACTION PURIFICATION ET IDENTIFICATION DES RADIOMETABOLITES

1) *Extraction*

Un extrait acétonique des échantillons de sang était préparé. L'acétone évaporée sous azote, les résidus obtenus étaient partitionnés entre du n-hexane et du méthanol à 80 %. Après évaporation du méthanol sous azote et vide léger à 40°C, les résidus étaient chromatographiés sur silice G par un développement du système n°8.

.../...

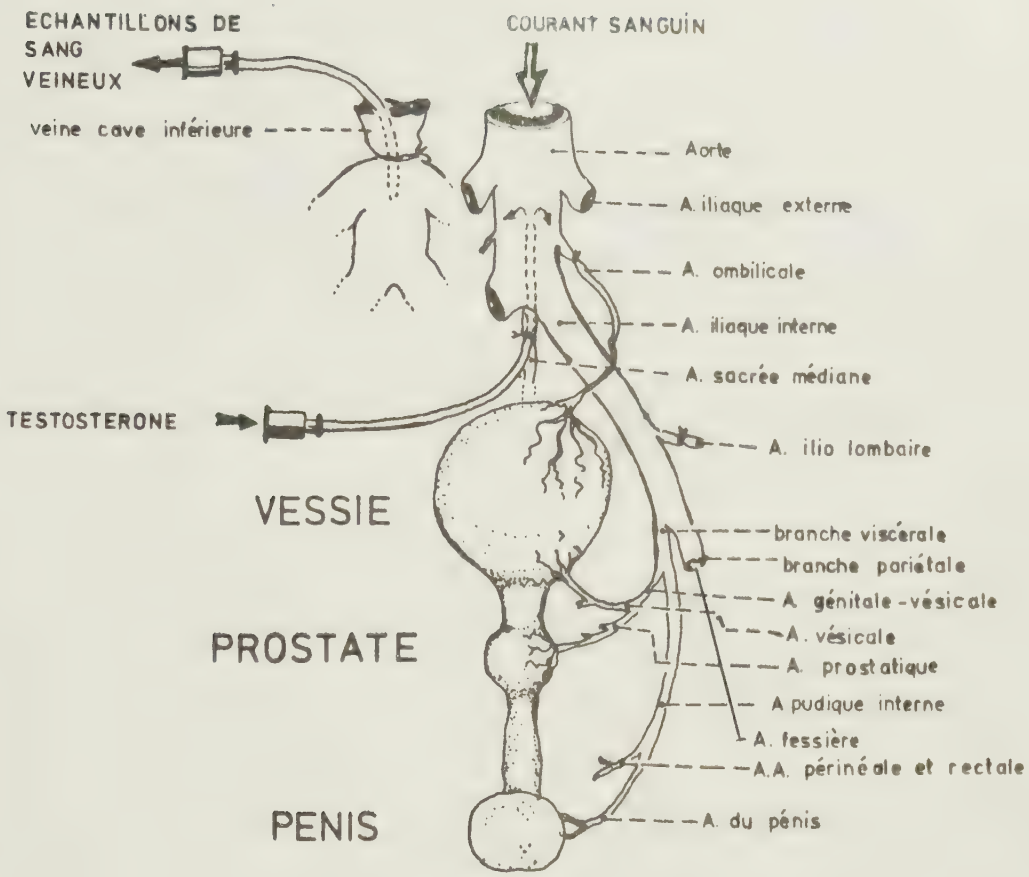


Figure 1 : Représentation schématique de la méthode utilisée in vivo : La testostérone radioactive était introduite dans le courant sanguin par l'artère sacrée médiane, et amenée au niveau de la prostate et de la vessie par le sang artériel .

TABLEAU 2

		Chiens	I	II	III	IV	V
	Animaux , poids	kg	31,5	41,0	29,0	36,0	25,0
	Injection de Testostérone-4-^{14}C	µg	32,80	35,28	53,58	52,88	52,40
		µCi	7,04	7,14	9,50	9,59	9,26
		ml	1	2	3	3	3
		min	2	2,5	10	10	10
	Sacrifié aprés	min	8	15	1	1	1
PROSTATE	Poids	g	39,4	42,5	31,0	19,0	15,5
	Radioactivité associée	dpm x 10^4	11,77	9,67	112,20	22,80	21,00
	Stéroïdes	nmoles	0,92	0,76	10,10	1,99	1,88
	De la quantité injectée	%	0,81	0,61	5,40	1,08	1,03
		*	23,3	17,8	325,9	104,6	121,0
VESSIE	Poids	g	33,2	29,5	34,0	48,0	20,0
	Radioactivité associée	dpm x 10^4	4,96	3,19	61,00	45,00	17,70
	Stéroïdes	nmoles	0,39	0,24	5,41	3,92	1,58
	De la quantité injectée	%	0,34	0,19	2,96	2,14	0,87
		*	11,6	8,0	159,2	81,6	79,0
FOIE	Poids	kg	0,87	1,07	0,68	1,08	0,65
	Radioactivité associée	dpm x 10^4	11,50	65,00	69,00	31,00	38,50
	Stéroïdes	nmoles	0,91	5,80	6,16	2,77	3,44
	De la quantité injectée	%	0,74	4,14	3,30	1,47	3,36
		*	1,0	5,4	9,1	2,5	5,3

* Poids de stéroïdes contenu dans l'organe exprimé en µmoles par gramme de tissu frais .

La prostate, la vessie et un morceau de foie étaient coupés en morceaux et conservés dans un mélange d'acétone-acétate d'éthyle (1 : 1) à 4°C dans les deux minutes qui suivaient leur prélèvement. Les tissus étaient ensuite homogénéisés dans ce même milieu au moyen d'un Waring Blendor, et les solvants clarifiés par centrifugation. Ce procédé d'extraction était répété deux fois sur le culot de débris obtenu après chaque centrifugation. La radioactivité de l'extrait total était mesurée par comptage des résidus de deux parties aliquotes.

2) *Délipidation*

Le résidu de l'extrait total était solubilisé dans du méthanol contenant 20 % d'eau. Les lipides non polaires étaient extraits de cette solution par trois partitions successives avec du n-hexane. La radioactivité perdue dans cette fraction était négligeable.

Le contenu en eau de la fraction méthanolique était augmenté jusqu'à 80 % et la suspension lactescente obtenue extraite trois fois avec un volume identique de chloroforme. Les extraits chloroformiques combinés contenaient de 83,5 % à 93,5 % de la radioactivité contenue dans l'extrait brut initial.

Le résidu obtenu après évaporation du chloroforme sous vide léger à 40°C et en présence d'azote était solubilisé dans un faible volume de chloroforme-n-hexane (1 : 1) et appliqué sur une couche mince de silice G. La plaque développée une fois avec du chloroforme était autoradiographiée.

Les zones radioactives, condensées sur le premier tiers de la plaque, étaient éluées avec de l'acétate d'éthyle. Cette chromatographie permettait d'éliminer le cholestérol estérifié, le cholestérol et des composés polaires non radioactifs, ce qui réduisait le poids de l'extrait sec à 9,0-14,5 mg sans autre perte de radioactivité.

3) *Chromatographie en couche mince des extraits purifiés*

Les constituants radioactifs des extraits purifiés provenant de prostates et de vessies étaient séparés sur une couche mince de silice G développée dans le système n°8. Leur visualisation et celle des stéroïdes standards radioactifs se faisait par autoradiographie.

Les zones radioactives en regard de chacun des standards utilisés étaient éluées (voir tableau 3). Certaines de ces zones contenaient plusieurs stéroïdes radioactifs. Une séparation plus poussée était obtenue par une

.../...

deuxième chromatographie sur alumine G, utilisant le système n°5 ou le système n°7.

Un double développement dans le système n°7 permet de séparer la (5α) dihydrotestostérone de l'androstérone et de l'*épi*androstérone, alors qu'un seul développement dans le système n°5 permet de séparer le dihydroxy-3α,17β (5α) androstane de son épimère en 3β.

4) *Analyse de radiohomogénéité par distribution à contre courant*

La distribution à contre courant du dérivé Enol-diacétate de la (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C a été effectuée dans un appareil de 100 tubes, automatique (E.C. Apparatus Corporation).

Les solvants (tétrachlorure de carbone/méthanol à 90 % étaient équilibrés pendant 24 heures en séquence de 24 minutes d'agitation suivies de 10 minutes de repos, avant l'addition du stéroïde radioactif à la phase inférieure du premier tube. La phase supérieure (méthanol 90 % après équilibration) était transférée sur 97 tubes avec les mêmes séquences d'agitation et de repos.

Le contenu des trente premiers tubes était recueilli séparément et dans le désordre. Après évaporation des solvants, le contenu de chaque tube était pesé par mesure directe sur une microbalance Mettler en observant les précautions décrites par AXELROD (4). La radioactivité de chaque tube était ensuite mesurée.

Les résultats obtenus ont été ensuite soumis à l'analyse statistique de la pureté radiochimique au moyen d'un ordinateur IBM 7094 en utilisant le programme décrit par PURDY (18).

RESULTATS

1) *Injection de testostérone-4-^{14}C dans la prostate et la vessie du chien*

Les données sur ces expériences sont présentées dans le tableau 2. La testostérone radioactive récupérée dans la verrerie et le cathéter a été retrouvée pure.

Le taux de stéroïdes radioactifs extraits de la prostate était substanciellement plus élevé que celui de la vessie. Une quantité suffisante de radioactivité était présente dans ces organes pour permettre la caractérisation sinon l'identification des stéroïdes radioactifs isolés.

. . /.

De la testostérone-4-^{14}C libre et pas d'autre stéroïde radioactif était trouvée dans le sang provenant de la veine cave inférieure. Cette testostérone apparaissait 2 minutes après le commencement de l'injection et persistait jusqu'à la mort de l'animal.

2) *Distribution des radiométabolites de la testostérone*

Le tableau 3 présente les mesures de radioactivité au niveau des différentes zones radioactives séparées par CCM pour les prostates et les vessies.

Chaque zone coincidant avec un stéroïde radioactif standard, était éluée et une partie aliquote utilisée pour les déterminations de radioactivité. Le reste de l'éluat était soumis à une seconde CCM sur alumine G ; les résultats obtenus dans ce dernier cas sont exposés dans le tableau 4.

3) *La testostérone-4-^{14}C au niveau de la prostate*

Les taux de testostérone-4-^{14}C retrouvée dans les extraits purifiés de prostate sont donnés dans le tableau 2 (zone 3). Ce taux varie entre 15,6 et 20,9 % de l'extrait total.

De la testostérone pure non radioactive (34,7µmoles) a été ajoutée à 1/3 de l'extrait brut (chien IV) avant délipidation. Après CCM sur silice GF_{254} avec un développement dans le système n°8 et élution, la testostérone avait une activité spécifique de 386 dpm/ µmole. Celle-ci était soumise à trois cristallisations successives (voir figure 2) au bout desquelles une activité spécifique constante de 351 dpm/ µmole était atteinte. On calculait par la suite que la testostérone identifiée dans ce cas correspondait à 14,6 % des stéroïdes radioactifs contenus dans la prostate (chien IV).

Pour identifier un possible contaminant, les eaux-mères obtenues après la première cristallisation ont été acétylées et soumises à la CCM sur silice G dans le système n°9. L'autoradiographie de la plaque a montré que la plus grande partie de la radioactivité migrait au niveau de l'acétate de testostérone-4-^{14}C utilisé comme contrôle. Une légère zone radioactive était cependant observée au niveau du diacétoxy-3α,17β (5α) androstane-4-^{14}C.

Les autres 2/3 de l'extrait brut de la prostate du chien IV ont été chromatographiés sur silice G dans le système n°8 après délipidation.

.../...

TABLEAU 3 : Radiométabolites dans la prostate et la vessie du chien aprés injection de testostérone-4-^{14}C .

	Prostate					Vessie				
Zone	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
1	-	15,9	3,7	4,6	3,5	4,3	-	9,8	8,4	6,8
2	13,0	10,0	13,6	17,6	13,2	-	-	-	-	-
3	18,7	20,9	19,4	15,6	19,6	79,1	100	70,4	75,0	76,3
4	51,7	43,9	46,7	48,1	51,2	3,6	-	4,1	3,0	2,0
5	7,7	4,3	9,0	9,4	7,5	13,0	-	12,3	10,9	10,7
6	8,0	4,9	7,6	4,6	5,0	-	-	3,4	2,7	4,2

Les résultats sont exprimés en pourcentages de la radioactivité totale mesurée sur le chromatogramme (couche mince de silice G, système n°8) . Les zones correspondent aux steroïdes authentiques marqués suivants : 2, Dihydroxy-3α,17β (5α) androstane; 3, Testostérone; 4, (5α) dihydrotestostérone; 5, Androstènedione; 6, (5α) androstanedione .La zone n°1 correspond à des métabolites polaires non identifiés .

TABLEAU 4 : Analyses des zones radioactives décrites dans le tableau 3.

		Prostates				Vessie
	SYSTEME DE CCM N°7	II	III	IV	V	III
Zone 3	Testostérone	20,9	19,4	15,6	19,6	-
Zone 4	*Epi*androstérone	2,6	6,7	-	-	-
Zone 4	Androstérone	1,5	2,0	-	-	-
Zone 4	Dihydrotestostérone	39,8	38,0	-	-	-
Zone 5	Inconnu	3,3	7,4	-	-	-
Zone 5	Androstènedione	1,0	1,2	-	-	-
Zone 6	Androstanedione	4,9	7,6	-	-	-
	SYSTEME DE CCM N°5					
Zone 2	Dihydroxy-3β,17β-5αA.	-	-	-	9,1	-
Zone 2	Dihydroxy-3α,17β-5αA.	-	-	-	4,1	-
	CRISTALLISATIONS					
Zone 2	Dihydroxy-3β,17β-5αA.	-	11,7	-	-	-
Zone 2	Dihydroxy-3α,17β-5αA.	-	-	3,7	-	-
Zone 3	Testostérone	-	-	14,6	-	-
Zone 4	*Epi*androstérone	-	4,7	-	-	-
Zone 4	Androstérone	-	1,4	-	-	-
Zone 4	Dihydrotestostérone	-	38,0	43,0	-	-
Zone 5	Androstènedione	-	-	-	-	12,3
Zone 6	Androstanedione	-	7,4	-	-	1,1

Les résultats sont exprimés en pourcentages de la radioactivité contenue dans chaque organe .

La testostérone contenue dans la zone 3 (tableau 2) est restée homogène en chromatographie sur alumine dans le système n°7. Il y a donc corrélation entre les résultats trouvés après cristallisation (14,6 %) et ceux obtenus par mesure sur le chromatogramme (15,6 %).

4) *Identification des métabolites prostatiques de la testostérone-4-^{14}C*

a) *Métabolites polaires*

Des métabolites polaires ont été mis en évidence par chromatographie de l'extrait purifié de prostate. La radioactivité associée à ces métabolites correspondait à la zone 1 (tableau 2) qui s'étend de l'origine du chromatogramme à la zone des (5α) androstanediols (zone 2). Cette radioactivité était localisée en grande partie à l'origine du chromatogramme.

L'oxydation chromique de cette zone a suggéré la présence de métabolites hydroxylés. Après oxydation, une CCM dans le système 8 permettait de retrouver 77 % de la radioactivité initiale légèrement au-dessus de la testostérone-4-^{14}C. Ce degré de polarité suggérait la formation d'une trione. La (5α) androstanetrione-3,7,17 essayée dans le même système chromatographique migrait à ce même niveau (voir chapitre V).

b) *Dihydroxy-3α,17β (5α) androstane-4-^{14}C et dihydroxy-3β,17β (5α) androstane*

Ces deux diols épimères ne se séparent pas en CCM sur silice G, mais leur mélange se résout par chromatographie sur alumine G en utilisant le sytème n°5. L'éluat de la zone 2 (tableau 2) contenait la totalité des (5α) androstanediols formés dans la prostate. L'autoradiographie d'une plaque d'alumine (tableau 3, chien V) a révélé la présence des deux épimères dans cet éluat. Le rapport des diols (épimère 3β/épimère 3α) était de 2,22.

Du dihydroxy-3β,17β (5α) androstane non radioactif (68,5 µmoles) a été ajouté à l'éluat de la zone des diols obtenus après chromatographie de l'extrait de prostate du chien II (zone 2, tableau 2). L'activité spécifique obtenue était de 1 189 dpm/µmole.

Le dérivé diacétylé de ce diol a été cristallisé quatre fois ; une activité spécifique de 1 027 dpm/ µmole était atteinte (figure 2).

La décroissance de l'activité spécifique a permis de calculer le taux de dihydroxy-3β,17β (5α) androstane-4-^{14} C présent dans l'extrait

.../...

analysé.

La fraction totale des (5α) androstanediols correspondant à 13,6 % de la radioactivité présente dans la prostate du chien III (tableau 2), on peut attribuer au dihydroxy-3β,17β (5α) androstane 11,7 % et par différence 1,9 % au dihydroxy-3α,17β (5α) androstane. Ainsi le rapport des deux diols (épimère 3β/épimère 3α) était dans ce cas de 6,17.

Du dihydroxy-3α,17β (5α) androstane non radioactif (68,5µmoles) a été ajouté à 2/3 d'un extrait brut non délipidé (prostate du chien IV). Après CCM dans le système n°8, l'activité spécifique de la zone des diols était de 693 dpm/µmole.

Le dérivé diacétylé était obtenu et cristallisé. Trois cristallisations étaient nécessaire pour arriver à une activité spécifique constante de 145 dpm/µmole. Sur les 17,6 % de la radioactivité imputée aux (5α) androstanediols, seulement 3,88 % pouvaient être le fait du dihydroxy-3α,17β (5α) androstane; par différence 14,2 % pouvaient être attribués à l'épimère en 3β. Ainsi le rapport des deux épimères (3β/3α) était de 4,20.

c) *(5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C*

Ce stéroïde reste contaminé par de l'androstérone et de l'*épi*androstérone après migration dans le système n°8 ; un double développement dans le système n°7 sur une plaque fraîchement activée d'alumine G permet de séparer la (5α) dihydrotestostérone des deux 17-cétones épimériques. Par ce procédé de séparation on a pu établir la présence de ces trois constituants dans l'éluat de la zone n°4 (tableau n°3).

La (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C a été caractérisée et identifiée dans les extraits de prostate de deux chiens de la manière suivante :

De la (5α) dihydrotestostérone pure non radioactive (69,0 µmoles) a était ajoutée à 2/3 d'un extrait brut non délipidé (extrait de prostate, chien IV). Une activité spécifique de 906 dpm/µmole était mesurée après délipidation et élution de la (5α) dihydrotestostérone du chromatogramme sur silice G (système n°8).

Lorsqu'après deux cristallisations une activité spécifique constante n'avait pas été atteinte, la dilution isotopique a été poursuivie ; 19,8 µmoles de (5α) dihydrotestostérone ont été ajoutées aux cristaux. De ce fait, l'activité spécifique était amenée à 302 dpm/µmole. Le dérivé énol-diacétate était alors formé (voir méthodes communes) et cristallisé à activité spécifique constante.

.../...

Cette activité spécifique constante, corrigée sur la seconde dilution isotopique était de 810 dpm/µmole. On calculait que la (5α) dihydrotestostérone représentait 43,0 % des stéroïdes radioactifs contenus dans la prostate du chien IV.

Dans le cas de l'extrait de prostate obtenu pour le chien III, la (5α) dihydrotestostérone non radioactive était ajoutée à l'éluat de la zone contenant la (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C après chromatographie sur alumine dans le système n°7. L'addition de 80,0 µmoles a permis d'atteindre une activité spécifique de 2120 dpm/µmole. L'androstérone et l'*épi*androstérone ayant été éliminées au cours de la chromatographie, la cristallisation du dérivé énol diacétate de la (5α) dihydrotestostérone n'a pas présenté de chute de l'activité spécifique.

Une activité spécifique constante était atteinte à 2280 dpm/µmole (figure 2).

Les eaux mères obtenues après la seconde cristallisation de ce dérivé ont été soumis à la distribution à contre courant. Le poids de stéroïde dans les eaux-mères a été amené à 1 mmole par addition de dérivé énol diacétate non radioactif. Sur un appareil de 100 tubes automatiques 97 transfers ont été effectués. Les résultats de l'analyse statistique faite par la suite sont présentés dans le tableau 5. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les coefficients des courbes quadratiques et leurs moyennes (valeurs P = K/K + 1). La courbe présentée sur la figure A a donc pu être tracée en utilisant les valeurs normalisées X (dpm) et Y (mg).

Une bonne corrélation peut être observée entre le tracé de cette courbe et les résultats obtenus du fait de l'erreur de mesure faible pour X et Y.

Aucune mesure significative de poids ou de radioactivité n'a été obtenue sur les tubes 31-97.

D'autre part, la possibilité de présence de nor-19 (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C et d'*épi*androstérone-4-^{14}C contaminant la (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C prostatique a été exclue de la façon suivante :

A 491 000 dpm de nor-19 (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C (voir méthodes communes pour la préparation de ce composé) ont été ajoutées 187,2 µmoles de (5α) dihydrotestostérone non radioactive. Ce mélange a été cristallisé deux fois et les activités spécifiques mesurées dans les cristaux

.../...

et les eaux-mères. L'activité spécifique initiale (2 620 dpm/µmole) décroissait rapidement ; elle était de 970 dpm/µmole pour les premiers cristaux, et de 14 dpm/µmole pour les seconds. Par contre la radioactivité dans les eaux-mères restait élevée.

Dans un autre cas similaire, 109 µmoles de (5α) dihydrotestostérone non radioactive étaient ajoutées à 65 300 dpm d'*épi*androstérone-4-^{14}C (voir méthodes communes pour la préparation de ce composé). Ce mélange cristallisé deux fois voyait son activité spécifique initiale (600 dpm/µmole) décroître très rapidement au niveau des cristaux (88 dpm/µmole pour les premiers, 16 dpm/µmole pour les seconds).

Ces expériences ont prouvé que le dérivé énol diacétate formé et cristallisé était bien celui de la (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C, et que ce composé est formé selon les taux calculés, dans la prostate à partir de la testostérone.

d) *Epiandrostérone-4-^{14}C et androstérone-4-^{14}C*

La fraction éluée après chromatographie sur alumine G dans le système n°7 (chien III, tableau 4) et correspondant à l'*épi*androstérone-4-^{14}C était additionnée de 50,2 µmoles de ce même composé non radioactif. L'activité spécifique initiale était de 605 dpm/µmole.

Après 4 cristallisations, une activité spécifique de 426 dpm/µmole était atteinte (figure 2). On calculait que le taux d'*épi*androstérone formé dans la prostate du chien III était de 4,7 %.

Chez ce même chien, la fraction correspondant à l'androstérone-4-^{14}C était éluée du chromatogramme sur alumine G et additionnée de 20,7 µmoles d'androstérone non radioactive. L'activité spécifique initiale était de 470 dpm/µmole. Après 3 cristallisations (figure 2), une activité spécifique constante de 332 dpm/µmole était atteinte. On calculait ainsi que l'androstérone-4-^{14}C correspondait à 1,4 % de la radioactivité extraite de la prostate du chien III.

Dans cet extrait, le rapport de ces deux épimères (3β/3α) était de 3,36.

e) *Radiométabolites possédant la mobilité chromatographique de l'androstènedione-4-^{14}C*

La radiohétérogénéité des éluats de la zone 5 (tableau 4) a été démontrée par chromatographie sur alumine G. La radioactivité attribuée à l'androstènedione dans le premier système chromatographique sur silice G

.../...

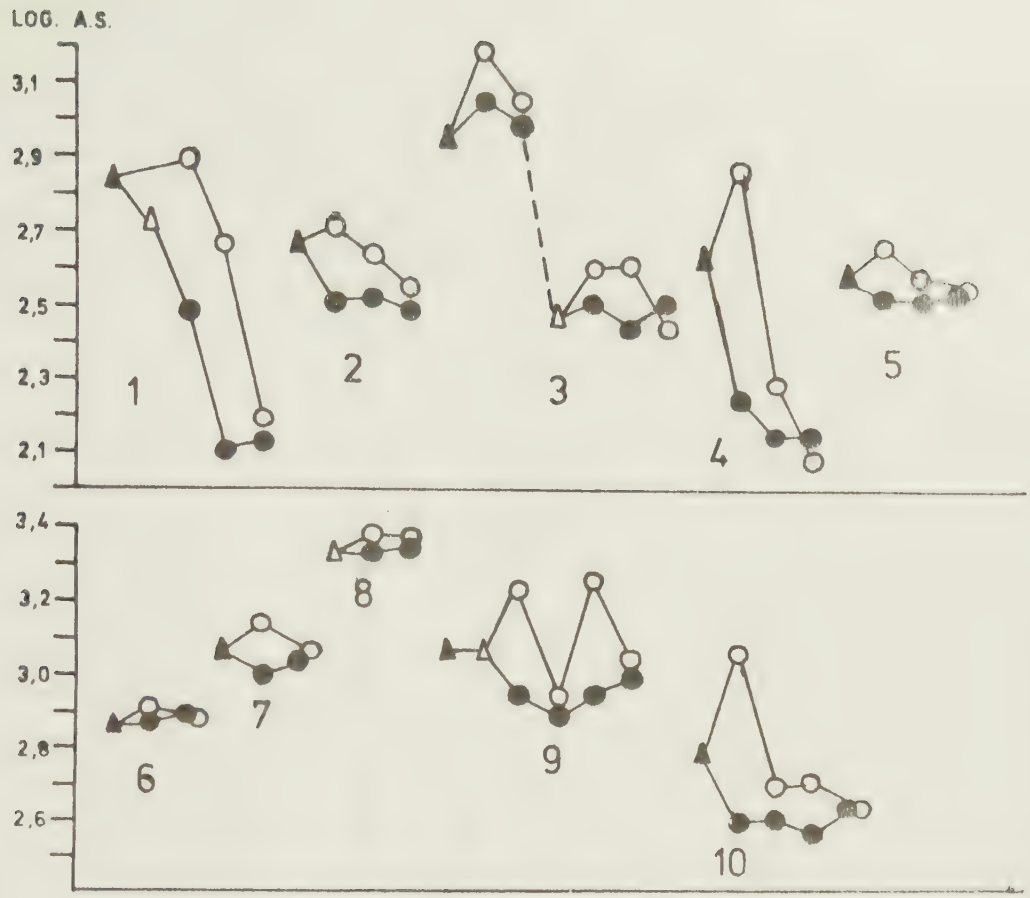


FIGURE 2

Cristallisation à activité spécifique constante des métabolites radioactifs formés dans la prostate et la vessie.

1 dihydroxy-3α,17β (5α) androstane ; prostate IV (A-1-2-4)
2 androstérone ; prostate III (1-2-3)
3 (5α) dihydrotestostérone ; prostate IV (1-4-E-2-4-4)
4 (5α) androstanedione ; vessie III (1-2-3)
5 testostérone ; prostate IV (1-2-2)
6 androstènedione ; vessie III (1-2)
7 (5α) androstanedione ; prostate III (1-2)
8 (5α) dihydrotestostérone ; prostate III (E-4-4)
9 dihydroxy-3β,17β (5α) androstane ; prostate III (A-1-2-5-5)
10 Epiandrostérone ; prostate III (1-2-4-1)
▲ stéroïde ; Δ dérivé ; ● cristaux
○ eaux-mères ; --- dilution isotopique
Les lettres et chiffres entre parenthèses correspondent à :
A dérivé acétate ; E dérivé énol diacétate
1 acétate d'éthyle/n-hexane ; 2 acétone/n-hexane
3 acétone/eau ; 4 éther/n-hexane ; 5 méthanol/eau

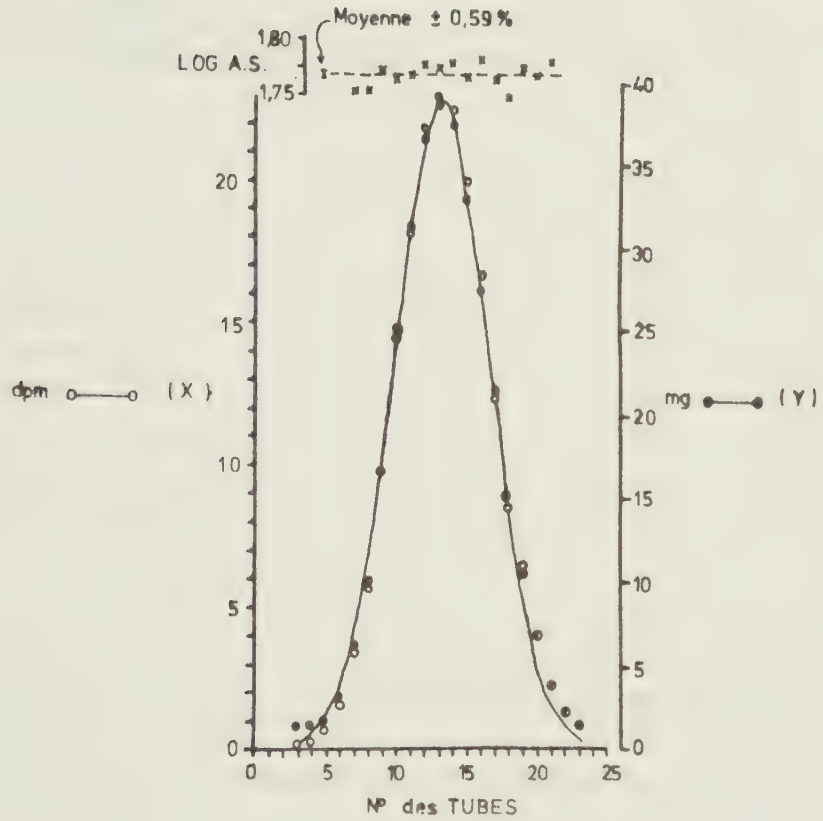


Figure 3 : Résultats et courbe théorique de la distribution à contre courant sur 97 tubes du dérivé énol-diacétate de la (5α) dihydrotestostérone. L'analyse statistique et la courbe théorique sont basées sur les résultats obtenus sur les 30 premiers tubes.

TABLEAU 5

ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS APRES DISTRIBUTION A CONTRE COURANT SUR 97 TUBES DU DERIVE ENOL-DIACETATE DE LA (5α) DIHYDROTESTOSTERONE .

	RADIOACTIVITE	POIDS	DIFFERENCE ± E.S.
Erreur sur les mesures	2,54%	2,87%	
Terme linéaire (B)	0,00608	0,00476	+0,00132 ± 0,00089
Terme quadratique (C)	0,20339	0,18705	+0,01634 ± 0,00035
Moyenne (M)	13,281	13,298	-0,017 ± 0,023
Coefficient de partage (K)	0,1636	0,1639	-0,0003
P = K / K+1	0,1406	0,1408	-0,0002 ± 0,0002
Déviation standard (θ)	3,326 §	3,397 §	-0,071

Le système de solvants : Méthanol 90% / Tétrachlorure de carbone, était utilisé .
L'analyse statistique du poids et de la radioactivité était faite sur les tubes n°1 à 30 choisis au hasard .
L'activité spécifique du dérivé était de 58,59 dpm/mg ± 0,59% .
§ *La valeur théorique de θ pour K = 0,1637 est de 3,44 .*

ne correspondait plus à ce stéroïde lorsque appliquée à la chromatographie sur alumine G dans le système n°7. Un métabolite radioactif, plus polaire que l'androstènedione était observé. La radioactivité associée avec l'androstènedione (environ 1 % de la radioactivité totale) était insuffisante pour permettre l'identification de l'androstènedione-4-^{14}C d'origine prostatique par cristallisation à activité spécifique constante.

f) *(5α) androstanedione-4-^{14}C*

L'éluat de la zone 6 (tableau 3) chromatographié sur alumine G présentait une mobilité identique à celle de la (5α) androstanedione utilisée comme standard.

A ce même éluat provenant de l'extrait de prostate du chien III, 45,1 µmoles de (5α) androstanedione pure non radioactive étaient ajoutées, portant l'activité spécifique initiale à 1 150 dpm/µmole. Après deux cristallisations une activité spécifique constante de 1 120 dpm/µmole était atteinte (figure 2). On calculait par la suite le taux de (5α) androstanedione-4-^{14}C contenue dans l'extrait de la prostate du chien III. Ce taux était de 7,4 %.

g) *Oxydation*

L'extrait de la prostate du chien V a été utilisé pour ces expériences. La moitié de cet extrait était oxydée avant délipidation, l'autre moitié délipidée et chromatographiée sur silice G dans le système n°8. Les composés séparés sur la plaque étaient élués individuellement et oxydés (voir méthodes communes).

Chaque produit d'oxydation était analysé par CCM sur silice G dans le système n°6 et les mobilités chromatographiques comparées avec celles de dicétones radioactives standards.

Après oxydation de l'extrait brut non délipidé, 73 % de la radioactivité initiale étaient retrouvés au niveau de la (5α) androstanedione-4-^{14}C et 21 % au niveau de l'androstènedione-4-^{14}C. Moins de 2 % de la radioactivité était présente au niveau de la (5β) androstanedione-3,17 ; cette quantité était insuffisante pour permettre une caractérisation convenable de ce stéroïde. La zone s'étendant de l'origine du chromatogramme à l'androstènedione contenait 1,7 % de la radioactivité totale.

L'oxydation de la zone 1 (tableau 3) a produit un composé radio-

.../...

actif non identifié (77 %). Ce composé possédait une polarité identique à celle d'une trione (voir chapitre V).

L'oxydation des zones 2 à 6 a permis d'obtenir les dicétones prévues ((5α) androstanedione et androstènedione) dans des proportions dépassant 90 % de la radioactivité soumise à l'oxydation. Cependant, une zone radioactive moins polaire que la (5α) androstanedione a été observée. Cette zone correspondait à 3,4 % des produits d'oxydation de la zone n°4 et à 5,0 % de ceux des zones n° 5 et 6 combinés.

IDENTIFICATION DES STEROIDES RADIOACTIFS DANS LES EXTRAITS DE VESSIE URINAIRE

a) *Testostérone-4-^{14}C*

La testostérone et l'hydroxy-3α (5β) androstanone-17 ne sont pas séparées lorsque leur mélange est chromatographié sur silice G avec le système n°8. Par contre leur séparation est obtenue lorsqu'une chromatographie sur couche mince d'alumine G est utilisée dans le système n°7.

Un mélange de testostérone et d'hydroxy-3α (5β) androstanone-17 non radioactives a été ajouté à l'éluat de la zone 3 (voir tableau 3) provenant de l'extrait de vessie du chien III. Ce mélange a été soumis à la chromatographie sur alumine G. La radioactivité associée à ce mélange a été retrouvée au niveau de la testostérone seule.

b) *Androstènedione-4-^{14}C*

L'éluat de la zone n°5 (tableau 3) soumis à la chromatographie sur couche mince d'alumine G dans le système n°7 est restée homogène contrairement à ce qui avait été observé pour la même zone provenant d'extraits de prostate.

A l'éluat de la zone n°5 provenant de l'extrait de vessie du chien III était ajoutée de l'androstènedione-3,17 non radioactive (70,0 µmoles). L'activité spécifique était alors de 730 dpm/µmoles. Cette activité spécifique restait constante après deux cristallisations successives (figure 2).

L'androstènedione-4-^{14}C était le métabolite principal de la testostérone-4-^{14}C dans la vessie et retenait 12,3 % de la radioactivité trouvée dans cet organe.

c) *(5α) androstanedione-4-^{14}C*

L'éluat de la zone n°6 du chromatogramme (tableau 3) donnait une seule zone radioactive après une seconde chromatographie sur couche mince

.../...

d'alumine G dans le système n°7. Cependant, l'addition de (5α) androstanedione non radioactive (34,5 µmoles) et trois cristallisations successives ont amené une décroissance rapide de l'activité spécifique. Celle-ci qui était de 435 dpm/µmole se stabilisait à 134 dpm /µmole après la troisième cristallisation.

On calculait par la suite que la (5α) androstanedione-4-^{14}C ne contribuait à la radioactivité totale trouvée dans l'organe que par 1,1 %.

La chute de l'activité spécifique au cours des cristallisations pouvait être le fait d'un composé radioactif isopolaire avec la (5α) androstanedione et non identifié.

DISCUSSION DES RESULTATS

Les expériences décrites ont permis d'introduire des quantités physiologiques de testostérone-4-^{14}C dans le sang artériel afférent à la prostate et à la vessie du chien adulte. L'étude du devenir de l'hormone radioactive, et l'identification de ses principaux métabolites a ainsi pu être accomplie avec le minimum d'interférences dues aux produits hépatiques transportés par le sang.

Après injection de la testostérone dans l'artère sacrée médiane (figure 1) seule l'hormone radioactive était trouvée dans le sang de la veine cave inférieure. La testostérone-4-^{14}C commençait à apparaître dans le sang veineux deux minutes après le début des perfusions. Ceci montrait que l'hormone avait été retenue dans les tissus perfusés et que le sang du chien n'avait pas métabolisé ce substrat dans les conditions expérimentales. Une observation identique avait été faite par AXELROD (19).

Il a été montré que lors d'expériences *in vitro* le dihydroxy-3α, 17β (5β) androstane-4-^{14}C était un métabolite principal de la testostérone-4-^{14}C dans le foie du chien (20).

L'absence de stéroïdes radioactifs réduits en 5β dans les extraits a démontré que la radioactivité retenue dans le prostate et la vessie n'était pas d'origine hépatique. Le dihydroxy-3α,17β (5β) androstane 4-^{14}C était présent dans les extraits de foie obtenus après ces injections.

Les métabolites radioactifs hydroxylés étaient extraits de la prostate en faible quantité et provenaient probablement plutôt du métabolisme de l'hormone dans cette glande que du foie.

.../...

Il faut journellement de 0,11 à 0,24 mg de testostérone par kilogramme pour maintenir un chien castré à la normale (21) ; ce taux est voisin de celui employé lors des injections décrites ici. L'hormone radioactive était injectée pendant 10 minutes au taux de 0,3 mg par heure.

En se basant sur le taux de radioactivité retrouvé dans les prostates et les vessies des chiens III, IV et V (tableau 1), on calculait que la concentration en stéroïdes radioactifs était de 0,1 à 0,3 µM dans les prostates et de 0,08 à 0,15 µM dans les vessies. Ces concentrations correspondaient respectivement à 1 et 5 % et à 0,9 et 3 % de l'hormone injectée.

Ces estimations de concentration en stéroïdes radioactifs dans les prostates de chiens sont du même ordre que celles déterminées par PEARLMAN (22) pour la prostate ventrale du rat après perfusion d'androstènedione-7 -^{3}H dans l'animal entier au taux de 0,5 mg par heure pendant 140 et 200 minutes.

De plus, et corrélant les résultats de cet auteur ainsi que ceux de HARDING et SAMUELS (23) pour la prostate ventrale du rat, la radioactivité dans la prostate et la vessie du chien était presque entièrement associée à des métabolites radioactifs non conjugués et en $C_{19}O_2$ et à de la testostérone non convertie.

En dépit de différences considérables dans la taille et le poids des prostates des cinq chiens utilisés, et l'utilisation de deux méthodes d'injections différentes, la testostérone-4-^{14}C retrouvée dans ces tissus correspondait à une proportion constante de la radioactivité retrouvée dans ces organes. Ceci met en évidence la localisation intracellulaire de l'hormone non métabolisée.

Au moins 50 % de la radioactivité dans la prostate a été trouvée associée aux métabolites réduits en 5α et hydroxylés en 17β ; la (5α) dihydrotestostérone, le dihydroxy-3α,17β (5α) androstane et son épimère en 3β . Pour chacune des injections effectuées, la (5α) dihydrotestostérone était le produit de transformation principal et correspondait à 35 % au moins de la radioactivité extraite de la prostate.

Ce stéroïde possède un effet androgénique supérieur à celui de la testostérone à l'essai sur la prostate du rat nouveau-né castré (24). BAULIEU (13) a récemment mis en évidence une activité préférencielle pour la (5α) dihydrotestostérone dans l'induction d'hyperplasie sur les épithéliums de prostate de rat en culture d'organe.

.../...

D'un autre côté, la prépondérance marquée des métabolites radioactifs hydroxylés en 3β (*épi*androstérone, dihydroxy-3β,17β (5α) androstane) sur les métabolites radioactifs hydroxylés en 3α (androstérone, dihydroxy-3β,17β (5α) androstane) suggère des différences entre ces deux test biologiques. Les stéroïdes en C_{19}, réduits en 5α et hydroxylés en 3α induisent une augmentation du poids de la prostate du rat nouveau-né castré, alors que leurs épimères en 3β sont inactifs (24).

Dans le test sur culture d'organe, l'androstérone et l'*épi*androstérone favorisent la division cellulaire (13), alors que le dihydroxy-3β, 17β (5α) androstane maintient la sécrétion et la taille des cellules mieux que la testostérone et sans provoquer de division cellulaire, et que le dihydroxy-3α,17β (5α) androstane est inactif (25).

Si l'on appuie sur la mise en évidence de la transformation de la testostérone en (5α) dihydrotestostérone dans la prostate du rat *in vivo* (26) et sur la rétention sélective de ce métabolite dans les noyaux de ce tissu (7,27), les résultats des expériences de perfusion chez le chien décrites ici suggérent que la (5α) dihydrotestostérone et le dihydroxy-3β, 17β (5α) androstane, métabolites de la testostérone dans la prostate, pourraient avoir des rôles séparés mais complémentaires dans l'expression de l'activité androgénique dans le tissu cible.

Le rapport des métabolites réduits en 5α et hydroxylés en 17β aux stéroïdes 17-cétoniques totaux contenus dans le tissu peut être utilisé pour mesurer les contributions relatives des voies métaboliques oxydatives et réductives de la testostérone. Un rapport de 4,62 a été calculé à partir des moyennes des résultats obtenus après cristallisation à activité spécifique constante, sur les prostates des chiens II et III.

Ce résultat reflète la formation relativement basse de 17-céto stéroïdes dans la prostate à partir de la testostérone ((5α) androstanedione, androstènedione, androstérone, épiandrostérone). Un composé polaire et au moins un métabolite hydroxylé restent non identifiés ; ces stéroïdes correspondaient à moins de 10 % de la radioactivité dans tous les extraits sauf un.

Contrairement à la prostate, le métabolisme de la testostérone-4-^{14}C dans la vessie était beaucoup moins important et suivait une voie métabolique oxydative.

.../...

L'androstènedione et la (5α) androstanedione étaient les deux métabolites principaux correspondant respectivement à 11-13 % et à 1 % de la radioactivité dans ces organes. Aucun stéroïde 17β-hydroxylé et réduit en 5α n'a pu être isolé.

La prostate et la vessie ont une origine embryonnaire commune ; la prostate provient de la portion pelvique du repli génito-urinaire alors que la vessie prend naissance en grande partie à proximité de l'allantoïs dans le même repli ; cette portion de la vessie est comme la prostate d'origine endodermique.

Le trigone de la vessie provient lui de la portion distale des tubes mésonéphriques et est donc d'origine mésodermique (28,29). On peut attendre des différences importantes dans ces deux organes quant au métabolisme de la testostérone, car après une différenciation complète la prostate et non la vessie devient un organe cible pour les androgènes.

Au cours de travaux similaires aux nôtres, WEINER (30) a mis en évidence que le métabolisme de la testostérone dans les glandes salivaires sous-maxillaires du chien était important et oxydatif, et que comme dans la vessie, la radioactivité des métabolites était associée principalement avec l'androstènedione.

Les différences du métabolisme de la testostérone dans la prostate, la vessie et les glandes salivaires sous-maxillaires du chien corrélent les conclusions de MAUVAIS-JARVIS (31,32) selon lesquelles la concentration urinaire du dihydroxy-3α,17β (5α) androstane en tant que produit terminal du métabolisme de la testostérone selon la voie des composés 17β hydroxylés réduits en 5α (33), est une expression du métabolisme de cette hormone dans les organes cibles et de ce fait un reflet de la différenciation sexuelle mâle.

.../...

CHAPITRE II

EFFETS DE LA CASTRATION ET D'UN ESTROGENE SUR LA STRUCTURE CELLULAIRE ET LE METABOLISME *IN VITRO* DES STEROIDES EN C-19 DANS LA PROSTATE DU CHIEN

INTRODUCTION

Le traitement, chez l'homme, du cancer de la prostate par des mesures antiandrogéniques est une pratique courante. Cette forme de thérapie est basée sur le fait que les lobes de la prostate humaine, comme chez le rat, répondent aux hormones sexuelles et que les adénocarcinomes de la prostate prennent naissance, chez l'homme, dans des zones sensibles aux androgènes (34).

Il existe peu de connaissances précises sur les effets des estrogènes ou de la gonadectomie au niveau du métabolisme des stéroïdes en C_{19}. De telles informations ont été rendues nécessaires par les travaux de MAUVAIS-JARVIS et de ses collaborateurs (31,32,37).

Ces travaux présentent des évidences selon lesquelles la différenciation sexuelle chez l'homme et l'action de l'hormone mâle chez l'adulte seraient corrélatifs du métabolisme des stéroïdes en C_{19} dans les organes cibles sensibles aux androgènes.

Des études récentes ont indiqué que la fonction et le développement de la prostate n'étaient pas le fait de la testostérone elle-même, mais plutôt celui de ses métabolites intracellulaires : les stéroïdes réduits en 5α et hydroxylés en 17β (6).

Nous avons montré que la (5α) dihydrotestostérone, le dihydroxy-3β,17β (5α) androstane et le dihydroxy-3α,17β (5α) androstane étaient les métabolites principaux de la testostérone après perfusion de celle-ci dans la prostate du chien (38).

La démonstration de la liaison sélective de la (5α) dihydrotestostérone par les noyaux de la prostate ventrale du rat (7,27) et la caractérisation de protéines cytoplasmiques et nucléaires ayant une grande spécificité pour ce métabolite de la testostérone (12,39,40,41,42) affirment le concept d'androgènes actifs au niveau des tissus qui en dépendent.

Ces résultats semblent conférer à la 5α réductase et aux 3α et 3β oxydoréductases des rôles clef dans la régulation de l'action de la testostérone au niveau de la prostate. Les systèmes enzymatiques qui assurent la régulation de la synthèse des formes actives hormonales devraient être affectés si l'on induit une carence en androgène par castration ou par des agents chimiques.

.../...

Le but des expériences décrites ici était de contrôler cette hypothèse sur un modèle animal convenable. Le chien a été choisi comme sujet d'expérience car sa prostate, comme celle de l'homme, peut avec l'âge donner naissance à des hyperplasies bénignes (6) ou à des adénocarcinomes (11), et que ces glandes métabolisent la testostérone de la même façon chez les deux espèces (5,15,43).

MULLIGAN (44) a montré que l'administration d'estrogènes ou la présence de tumeurs des cellules de Sertoli déterminent l'apparition de métaplasie squameuse dans la prostate du chien ; les tumeurs de cellules de Sertoli transforment activement la prégnénolone et la déhydroépiandrostérone en estrogènes (45,46).

D'un autre côté, la castration cause chez le chien l'atrophie des cellules épithéliales de la prostate (47). Ces lésions distinctes ont été utilisées en tant que critères histologiques pour la comparaison des métabolismes des stéroïdes en C_{19} par la prostate chez les chiens castrés ou traités par les estrogènes.

Un rapport préliminaire présentant ces travaux a été publié (48); nous y montrions que l'ECP induit des modifications significatives de la structure cellulaire de la prostate, et que le métabolisme de la testostérone dans celle-ci devenait oxydatif.

Les résultats présentés ici ont été soumis pour publication à "Endocrinology" sous le titre de : "Estrogen and castration-induced effects on canine prostatic fine structure and C_{19}-steroid metabolism" (octobre 1970).

OPERATION DES CHIENS

a) *Biopsie*

Onze chiens adultes bâtards ont été utilisés. Ces chiens, choisis après un examen complet, étaient jugés normaux.

Les chiens étaient anesthésiés par injection intra veineuse de Nembutal (30 mg/Kg).

Après laparotomie, des spécimens pesant environ 1,5 g étaient prélevés sur la surface ventrale de la prostate. La biopsie sur le chien n° 1, faite par voie périnéale, utilisait une aiguille creuse selon le procédé décrit par LEEDS et LEAV (49).

.../...

Après prélèvement d'échantillons pour examen histologique, le reste du spécimen était placé dans du sérum physiologique à 4°C et transporté dans une chambre froide.

Seuls deux chiens n'ont pas subi de prélèvement (chiens n°11 et 12, voir tableau 6) avant l'injection de l'estrogène ou la castration.

b) *Castration*

Les chiens étaient castrés selon la procédure décrite par LACROIX (50) immédiatement après le prélèvement de la biopsie. Des sections des testicules étaient soumises à des examens histologiques. La castration nécessitait 15 minutes additionnelles aux 20 minutes prises par la biopsie de la prostate.

c) *Administration d'ECP*

Les chiens opérés ne subissaient l'injection d'ECP qu'une semaine après l'opération. Une injection intramusculaire de 2 mg d'ECP était faite aux chiens n°1,2,5 et 11 (voir tableau 6) et renouvelée 3 semaines plus tard.

Une semaine après la dernière injection, le chien était tué par injection intra-veineuse d'une dose léthale de Nembutal. L'animal mort, celui-ci était rapidement ouvert et la prostate prélevée. La prostate présentait une cicatrice au niveau où la biopsie avait été faite.

Les échantillons du tissu pour les études du métabolisme des stéroïdes en C_{19} étaient prélevés sur la face dorsale de la prostate à l'opposé de la cicatrice. Le reste était utilisé pour des examens histologiques. Après prélèvement de la prostate, chaque animal subissait une autopsie complète.

HISTOLOGIE

a) *Examens au microscope optique*

Docteur I. LEAV, vétérinaire et pathologiste à l'Angell Memorial Hospital (Boston) effectuait les examens et la préparation des tissus. Les méthodes utilisées et les résultats de ces examens ne seront pas donnés en détail ici. Les conclusions qui en sont tirées seront cependant utilisées dans la discussion.

Docteur LEAV est l'auteur du manuscrit qui a été soumis pour publication de ces travaux à Endocrinology.

.../...

b) *Examens au microscope électronique*

Docteur L.F. CAVAZOS, professeur d'anatomie à la Tufts Medical School (Boston) effectuait la préparation des tissus et leur examen au microscope électronique.

Les résultats de ces examens ne seront pas reportés en détail ici, mais les conclusions qui peuvent en être tirées seront utilisées dans la discussion des résultats des manipulations biologiques. Docteur CAVAZOS est coauteur du manuscrit qui a été soumis pour publication à Endocrinology.

INCUBATION DES TISSUS

Le tissu frais, transporté dans la chambre froide dans du sérum physiologique était égoutté sur de la gaze hydrophile et broyé finement avec des ciseaux. Le broyat obtenu était utilisé pour les incubations, par quantités de 100 mg.

Chaque incubation se faisait dans un volume total de 1,25 ml de tampon phosphate 0,067 M (pH 7,4) qui contenait 610 pmoles du substrat marqué au ^{14}C, 50 µmoles de nicotinamide, 1,34 µmoles de NADPH ou bien 1,51 µmoles de NAD+ & 1,51 µmoles de NADP+. Après addition de 100 mg du broyat de prostate, les incubations étaient conduites à 37°C pendant une heure.

Les réactions enzymatiques étaient arrêtées par addition de 6 ml d'acétate d'éthyle suivie d'une agitation vigoureuse et de la mise du tube dans un congélateur à - 18°C. Des contrôles bactériologiques étaient effectués avant et après l'incubation des tissus (5).

EXTRACTION ET CARACTERISATION DES METABOLITES

a) *Extraction*

La couche de solvant était prélevée dans chaque tube au sortir du congélateur. La fraction glacée aqueuse se liquéfiait à température ambiante et était extraite deux fois avec de l'acétate d'éthyle. Le rendement des extractions était déterminé en mesurant la radioactivité contenue dans 1/40 de l'extrait.

b) *Caractérisation*

Les extraits concentrés sous azote étaient fractionnés par CCM

.../...

sur silice G dans le système n°8, et les stéroïdes radioactifs localisés sur le chromatogramme par autoradiographie. Le gel des zones radioactives correspondant aux standards radioactifs utilisés (dihydroxy-3α,17β (5α) androstane-4-^{14}C, testostérone-4-^{14}C, (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C, androstènedione-4-^{14}C, (5α) androstanedione-4-^{14}C) était transféré de la plaque dans des fioles pour comptage direct ou pour élution avec des solvants appropriés. Lorsque l'*épi*androstérone était le métabolite principal dans la zone de la (5α) dihydrotestostérone, un seul développement sur silice G dans le système n°8 permettait de séparer partiellement ce composé de la (5α) dihydrotestostérone et de l'androstérone ; cette séparation était complète lorsqu'une chromatographie bidimensionnelle était effectuée.

La (5α) dihydrotestostérone était séparée de l'androstérone et de l'*épi*androstérone par chromatographie sur alumine G dans le système n°7. Ce même système permettait de séparer l'androstènedione d'un radiométabolite non identifié.

La CCM sur alumine G dans le système n°5 permettait de séparer un mélange de dihydroxy-3α,17β (5α) androstane et de dihydroxy-3β,17β (5α) androstane. L'identification des radiométabolites purifiés se faisait par dilution isotopique suivie de cristallisation à activité spécifique constante.

c) *Expression des résultats*

La radioactivité contenue dans chaque zone visible sur l'autoradiogramme était mesurée. Ces mesures étaient transformées en picomoles de radiométabolites formés, après correction par le pourcentage de radioactivité initiale extraite (90-95 %).

RESULTATS

L'examen des spécimens au microscope optique a permis de contrôler l'apparition de la métaplasie squameuse de la prostate chez les chiens traités à l'ECP, et l'atrophie des glandes chez les chiens castrés (tableau 6).

Les expériences de contrôle effectuées sur les chiens n°8, 10 et 11 ont montré que le choc chirurgical introduit par la biopsie n'induit ni la métaplasie squameuse ni l'atrophie de la prostate.

.../...

TABLEAU 6

PROGRAMME EXPERIMENTAL ET RESULTATS DES OBSERVATIONS HISTOLOGIQUES

	BIOPSIE			POST MORTEM	
CHIEN N°	PROSTATE	TESTICULES	TRAITEMENT	PROSTATE	TESTICULES
1, 2, 5,	HYPERPLASIE		ECP	METAPL. SQ.	ASPERMATOGENESE
3, 4,	HYPERPLASIE		-	HYPERPLASIE	NORMAUX
7, 9,	HYPERPLASIE	NORMAUX	CASTRATION	ATROPHIE	
8,10,	HYPERPLASIE		CONTROLES	HYPERPLASIE	NORMAUX
11,	-		ECP	METAPL. SQ.	ASPERMATOGENESE
12	-		-	HYPERPLASIE	NORMAUX

ECP = Estradiol-17β cyclopentanepropionate - = non effectué

METAPL. SQ. = Métaplasie squameuse

1 - ANIMAUX INTACTS ET ANIMAUX CONTROLES

Les tissus utilisés pour les recherches histologiques et les incubations avec des stéroïdes radioactifs provenaient des échantillons prélevés lors des biopsies des animaux intacts, ou des prostates obtenues *post mortem* sur les animaux ayant subi la biopsie seule cinq semaines auparavant.

a) *Métabolisme de la testostérone-4-*^{14}C

Sept animaux intacts ont subi une biopsie de la prostate. Les extraits obtenus après incubation des broyats de tissus ont été soumis à la CCM, et les plaques obtenues autoradiographiées. Quatre zones radioactives, observées dans chaque cas, correspondaient à des radiométabolites en $C_{19}O_2$ (figure 4) et une autre zone à des produits de transformation polaire. Les moyennes des mesures faites sur chacune des ces zones ont été utilisées pour comparer la formation des métabolites de la testostérone chez les chiens intacts avec celles obtenues chez les chiens ayant subi des manipulations antiandrogéniques (figure 5).

La composition en radiométabolites de chacune de ces zones radioactives a été étudiée en détail dans le cas d'un chien intact (chien n°12) sur une incubation de testostérone-4-^{14}C avec du broyat de prostate en présence de NADPH.

Les produits de transformation polaire qui s'étendent de l'origine du chromatogramme à la zone des (5α) androstanediols n'ont pas été identifiés ; leurs mobilités chromatographiques correspondaient à celles de stéroïdes en $C_{19}O_3$.

Les constituants de la zone A, correspondant au dihydroxy-3α,17β (5α) androstane, ont été séparés par chromatographie de l'éluat sur alumine G dans le système n°5.

Le dihydroxy-3β,17β (5α) androstane et le dihydroxy-3α,17β (5α) androstane ont ainsi été mis en évidence dans le rapport de 1,49/1 (43) et identifiés par cristallisation à activité spécifique constante après dilution isotopique (figure 6).

Les radiométabolites de la zone B, correspondant à la (5α) dihydrotestostérone, ont été séparés par chromatographie de l'éluat sur alumine G. dans le système n°7. Cette zone était constituée de 80 % de (5α) dihydrotestostérone et de 20 % d'un mélange d'androstérone et d'*épi*androstérone.

.../...

L'identité et la radiohomogénéité de la (5α) dihydrotestostérone (38) était prouvée par cristallisation à activité spécifique constante après dilution isotopique (figure 6).

Une même CCM sur alumine G dans le système n°7 a séparé l'androstènedione (75 %) d'un composé radioactif inconnu. L'androstènedione était identifiée par cristallisation à activité spécifique constante après dilution isotopique (figure 6). Le composé radioactif inconnu avait les mêmes propriétés chromatographiques que celui rencontré lors des expériences de perfusion de prostate de chien (voir chapitre I). Dans la zone D, seule de la (5α) androstanedione était mise en évidence.

L'incubation, en présence de NADPH, de testostérone-4-^{14}C avec les broyats des prostates des animaux contrôle produisait des zones identiques contenant une proportion semblable de ces métabolites. Ainsi, la zone B contenait 88 % de (5α) dihydrotestostérone et 12 % d'androstérone et d'*épi*androstérone, et la zone C était constituée de 73 % d'androstènedione et de 27 % du métabolite inconnu.

Les zones B provenant d'incubations similaires en présence de NAD+ et de NADP+ n'ont pas été soumises à la CCM sur alumine G. Ces zones contenaient probablement des quantités plus importantes d'*épi*androstérone et d'androstérone et moins de (5α) dihydrotestostérone.

L'addition de cofacteurs aux incubations de broyats de prostate permettait d'obtenir un taux plus important du métabolisme de la testostérone -4-^{14}C (figure 5). En présence de NADPH, la formation de métabolites réduits en 5α et hydroxylés en 17β prédominait alors que l'addition de NAD+ et de NADP+ déterminait la prépondérance des métabolites 17-cétoniques.

Lorsqu'aucun cofacteur n'était ajouté aux incubations, le métabolisme de la testostérone se déroulait selon les voies réductives et oxydatives. Ceci reflétait la concentration en cofacteurs oxydés et réduits présents dans le tissu et utilisés lors des oxydations et des réductions des stéroïdes.

b) *Métabolisme de l'androstènedione-4-^{14}C*

En présence de NADPH, les broyats de prostate des 7 chiens intacts convertissaient l'androstènedione en trois métabolites principaux : l'*épi*-androstérone et l'androstérone (figure 4, zone B) et la (5α) androstanedione (zone D). La (5α) dihydrotestostérone était un constituant mineur de la zone B ; des quantités négligeables de testostérone et de (5α) androstane-

.../...

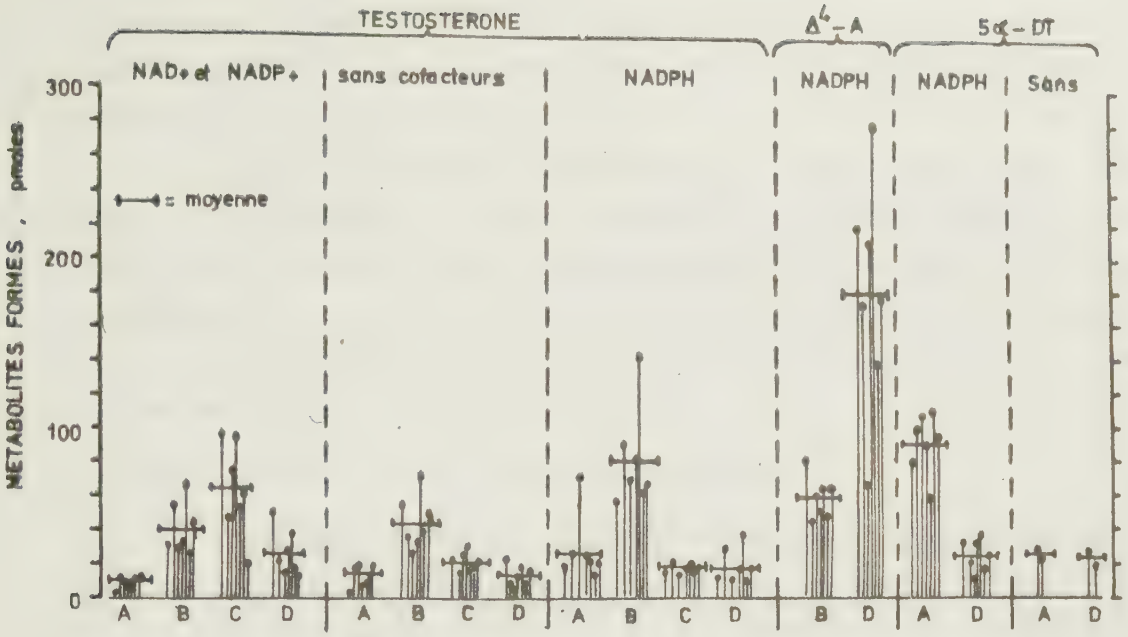


FIGURE 4 : Métabolisme de stéroides en C-19 par des broyats de prostate provenant de sept chiens normaux ; les incubations consistaient en 1,25 ml de tampon phosphate 0,067 M (pH 7,4) contenant 50 µmoles de nicotinamide, 100 mg de tissu et 610 pmoles de testostérone ou d'androstènedione ou de (5α) dihydrotestostérone radioactives. Les incubations en présence de cofacteurs contenaient aussi soit 1,34 µmoles de NADPH soit 1,51 µmoles de NAD+ et 1,51 µmoles de NADP+. Les incubations étaient faites à 37° C pendant 60 minutes. Les lettres A, B, C, D, correspondent respectivement aux métabolites élués des zones isopolaires avec le dihydroxy-3α,17β (5α) androstane, la (5α) dihydrotestostérone, l'androstènedione et la (5α) androstanedione.

Δ4-A = Androstènedione, 5α-DT = (5α) dihydrotestostérone

diols étaient observées sur le chromatogramme au-dessus de produits de transformation polaire possédant les mobilités chromatographiques de stéroïdes en $C_{19}O_3$.

Aucune différence, quantitative ou qualitative n'était observée entre ces incubations et celles provenant des animaux contrôle. Dans les conditions décrites, l'androstènedione était métabolisée 1,7 fois plus que la testostérone ; une (5α) réduction plus importante et l'accumulation des produits de transformation polaires (figure 5) expliquent cette augmentation du métabolisme

c) *Métabolisme de la (5α) dihydrotestostérone*

La quantité de (5α) dihydrotestostérone métabolisée était plus importante lorsque du NADPH était ajouté dans le milieu d'incubation (figure 4 et 5). Le dihydroxy-3β,17β (5α) androstane, le dihydroxy-3α,17β (5α) androstane et la (5α) androstanedione ont été mis en évidence dans les extraits d'incubations en présence de NADPH. Les deux diols épimères prédominaient dans un rapport (3β/3α) de 1,29/1.

Des trois substrats utilisés, la (5α) dihydrotestostérone semble être le meilleur pour l'hydroxylation : les stéroïdes polaires en $C_{19}O_3$ prédominaient dans les incubations sans cofacteurs. En présence de NADPH, une quantité plus importante de substrat était transformée dans les incubations des broyats de prostate des animaux contrôle que dans celles des chiens intacts.

ANIMAUX TRAITES AUX ESTROGENES

A l'examen histologique, la métaplasie squameuse était observée dans la prostate des trois chiens traités. Les tissus prélevés *post mortem* étaient utilisés pour des incubations avec différents substrats.

a) *Métabolisme de la testostérone-4-^{14}C*

Les broyats de prostate de chiens traités par l'ECP métabolisaient 2,2 fois plus de substrats que ceux provenant de chiens normaux (figure 5). Un changement important de la distribution des métabolites étaient aussi observé : la testostérone était transformée principalement en androstènedione par le tissu squameux selon une voie métabolique oxydative. L'addition de NADPH aux incubations ne rendait pas ce métabolisme réductif, ou

.../...

même davantage oxydatif si l'on suppose que du NADP+ aurait pu être produit dans le tissu par action de la NADPH-oxydase.

L'addition de cofacteurs oxydés aux incubations (NADP+ & NAD+) ayant néanmoins substanciellement augmenté la transformation du substrat en androstènedione, on peut penser que la 17β oxydoréductase prostatique admet NAD+/NADH comme cofacteur chez les chiens traités par l'ECP.

L'identification de l'androstènedione, de la (5α) androstanedione et de la testostérone non métabolisée a été effectuée par cristallisation à activité spécifique constante après dilution isotopique (figure 6). La zone contenant l'androstènedione soumise à la CCM sur alumine G dans le système n°7 ne contenait pas le métabolite inconnu observé dans le cas des chiens intacts.

b) *Métabolisme de l'androstènedione-4-^{14}C*

Même en présence de NADPH, les incubations accusaient une diminution importante de la quantité de substrat métabolisée. Les métabolites, réduits en 5α, avaient particulièrement décru (figure 5).

c) *Métabolisme de la (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C*

De la même façon que pour les incubations de testostérone-4-^{14}C, sans cofacteurs exogénes, on observait une augmentation du taux de substrat métabolisé par rapport à celui de tissus normaux, ainsi qu'un changement de voie métabolique, la voie oxydative prenant le pas sur la voie réductive normale. La (5α) androstanedione était formée par le tissu squameux aux dépends des dihydroxy (5α) androstanes épimériques formés dans le tissu normal. L'addition de NADPH ne permettait pas de retrouver un métabolisme réductif prédominant.

ANIMAUX CASTRES

L'effet de la gonadectomie sur la prostate était caractérisé par une atrophie partielle de cette glande.

a) *Métabolisme de la testostérone-4-^{14}C*

Les broyats de prostate provenant de chiens castrés métabolisaient relativement moins la testostérone que des préparations similaires provenant de chiens intacts.

../...

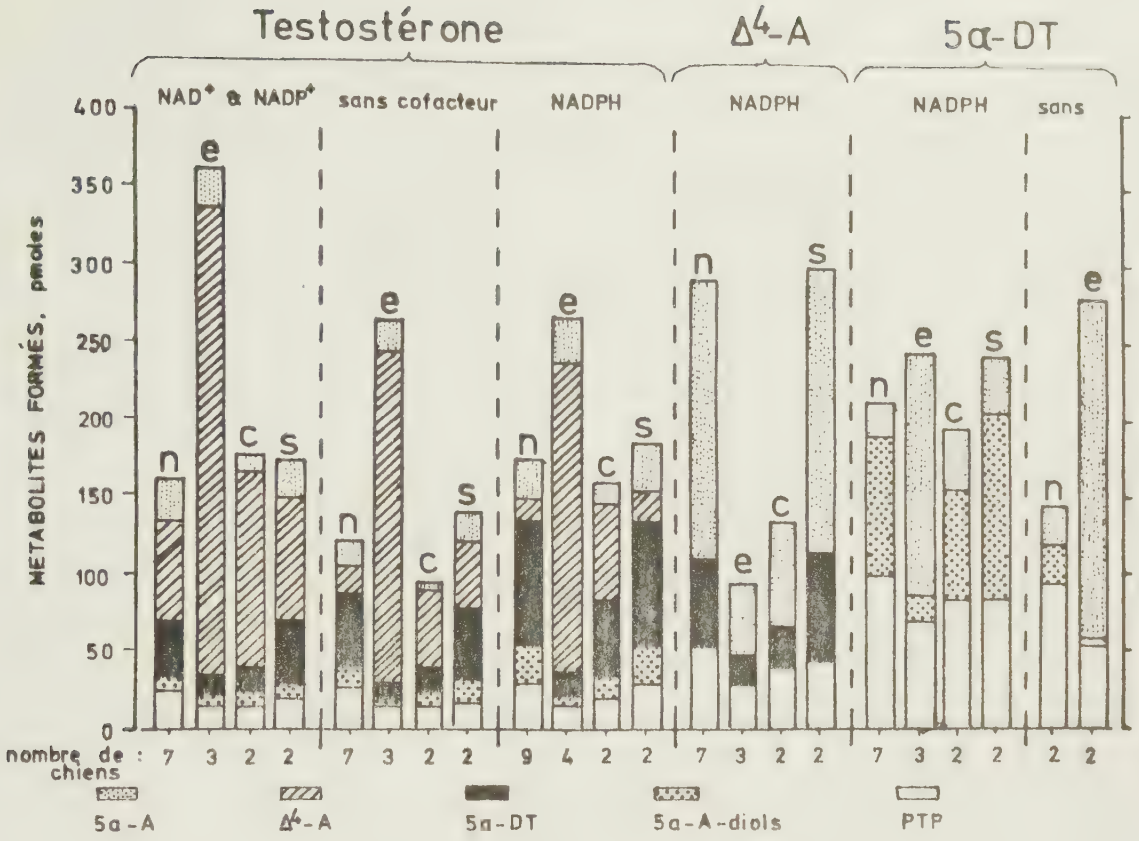


Figure 5

Métabolisme de stéroïdes en C-19 par des broyats provenant de chiens intacts, castrés, ou traités par l'ECP.

n = tissu normal obtenu après biopsie
e = tissu obtenu après traitement par l'ECP
c = tissu obtenu après castration
s = tissu obtenu sur un animal contrôle
5α-A = (5α) androstanedione
5α-A-diols = dihydroxy-3β,17β (5α) androstane et épimère en 3α
PTP = produits de transformation polaire
Chaque diagramme représente les métabolites élués des zones isopolaires en CCM avec les standards radioactifs décrits.

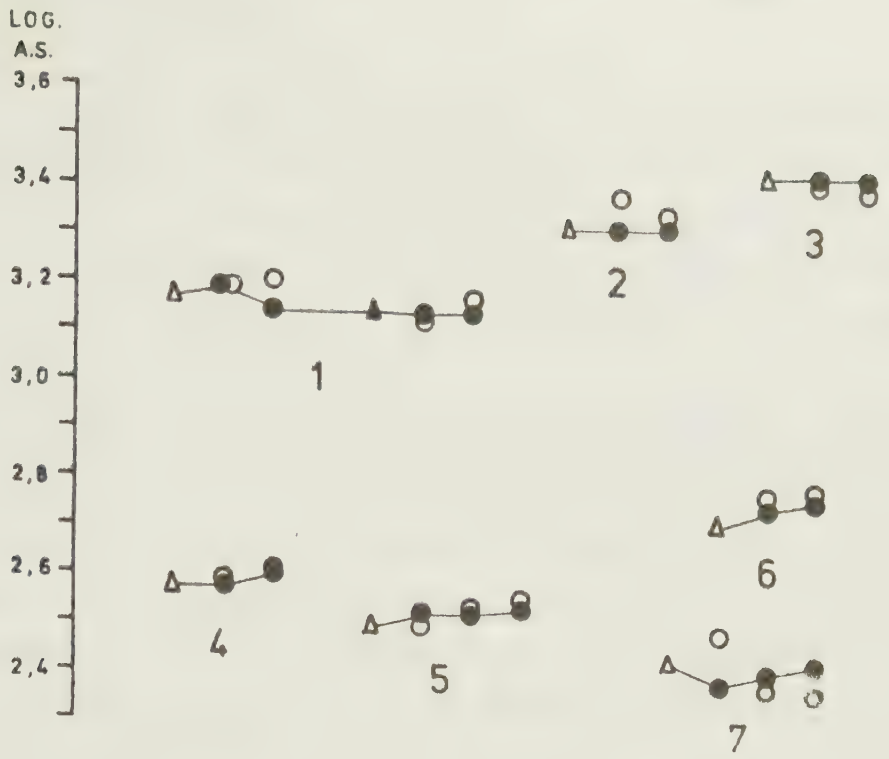


Figure 6

Cristallisations à activité spécifique constante.

1 - (5α) dihydrotestostérone, du chien normal n°12 (1-2-D-5-6)
2 - testostérone du chien n°11 traité à l'ECP (1-2)
3 - androstènedione du chien n°11 traité à l'ECP (1-2)
4 - androstènedione du chien normal n°12 (1-2)
5 - dihydroxy-3α,17β (5α) androstane du chien normal n° 12 (2-3-4)
6 - (5α) androstanedione du chien n°11 traité à l'ECP (1-2)
7 - dihydroxy-3β,17β (5α) androstane du chien normal n°12 (1-2-3)
Les systèmes de solvants suivants (chiffres et lettre entre parenthèses) ont été utilisés pour les cristallisations : 1/ acétate d'éthyle/n-hexane, 2/ acétone/n-hexane, 3/ acétone/eau, 4/ méthanol/eau, 5/ éther/n-hexane, 6/ n-hexane, D/ dérivé énol diacétate.
Δ stéroïde après dilution isotopique, ● cristaux, O eaux-mères
▲ dérivé énol diacétate.

De même, et toujours en l'absence de cofacteurs d'origine externe, les prostates de chiens castrés métabolisaient beaucoup moins la testostérone que celles provenant d'animaux traités par l'ECP.

Cependant, mais d'une façon bien moins marquée, le changement de voie de métabolisme observé chez les chiens traités aux estrogènes était aussi apparent chez les chiens castrés.

Dans le cas d'incubations en présence de NADPH, les extraits chromatographiés sur silice G dans le système n°8 présentaient une zone radioactive importante isopolaire avec la (5α) dihydrotestostérone standard ; cette zone rechromatographiée sur alumine G dans le système n°7 contenait 95 % de (5α) dihydrotestostérone et 5 % d'androstérone et d'*épi*-androstérone. La zone correspondant à l'androstènedione analysée d'une manière identique était chromatographiquement pure et ne présentait pas le métabolite inconnu décrit dans le cas de chiens intacts.

b) *Métabolisme de l'androstènedione-4-*^{14}C

La diminution du métabolisme de ce substrat, observée sur les incubations en présence de NADPH de broyats de prostates provenant de chiens traités par l'ECP était également notée pour les chiens castrés. Cette diminution s'exprimait par une formation beaucoup moins importante de métabolites (réduits en 5α), en particulier de la (5α) androstanedione.

c) *Métabolisme de la (5α) dihydrotestostérone-4-*^{14}C

L'incubation de ce substrat en présence de NADPH avec des broyats de prostates provenant de chiens castrés produisait une série de métabolites complétement différente de celle obtenue avec les prostates de chiens traités par l'ECP. Le changement de voie métabolique observé chez ces animaux n'était pas retrouvé après castration.

D'une certaine manière, la série de métabolites obtenue était comparable à celle produite par les prostates de chiens intacts.

METABOLISME PROSTATIQUE DES STEROIDES EN $C_{19}O_2$ APRES TRAITEMENT PAR L'ECP OU CASTRATION

UTILISATION DE LA MEME GLANDE AVANT ET APRES TRAITEMENT

La représentation graphique des résultats expérimentaux (figure 5) utilise la moyenne des résultats de chaque groupe expérimental. .../...

La présentation des tableaux 7 et 8 permet d'évaluer la contribution relative des voies métaboliques oxydatives et réductives dans la prostate de chaque chien avant et après traitement.

Les voies métaboliques oxydatives et réductives correspondent à celles décrites *in vivo* par BAULIEU et MAUVAIS-JARVIS (33), et les métabolites choisis pour les différencier correspondent respectivement aux stéroïdes 17-cétoniques et aux stéroïdes 17β-hydroxylés.

Dans nos travaux, la zone radioactive possédant les propriétés chromatographiques de la (5α) dihydrotestostérone sur silice G n'a pas été dans tous les cas analysée par CCM sur alumine G dans le système n° 7. De ce fait l'androstérone et l'*épi*androstérone présents en petite quantité dans cette zone ont été introduits en tant que métabolites 17β-hydroxylés dans les rapports présentés dans les tableaux 7 et 8.

La comparaison des métabolismes de la testostérone et de la (5α) dihydrotestostérone dans chaque prostate montre clairement que l'ECP administré cause un changement très important des voies métaboliques *in vitro*.

Le métabolisme presqu'uniquement réductif avec des prostates de chiens intacts devient presqu'uniquement oxydatif après traitement de l'animal par l'ECP.

Cette altération métabolique n'était pas le fait du traumatisme chirurgical introduit par la biopsie ; la prostate du chien n° 11, (tableau 6) qui n'avait pas subi cette biopsie, ne formait pas plus de métabolites réduits en 5α et hydroxylés en 17β que celles qui l'avaient subie.

Ce changement des voies métaboliques peut être également observé sur les prostates des animaux castrés, mais il est bien moins prononcé que dans les glandes des animaux traités par l'ECP.

En présence de NAD+ et de NADP+, ou sans cofacteurs exogènes, la prostate du chien n°10 formait davantage de 17-cétostéroïdes à partir de la testostérone que la biopsie prélevée quatre semaines plus tôt.

Contrairement aux chiens castrés ou traités par l'ECP, ce changement de voie métabolique était inexistant dans les cas d'incubations en présence de NADPH.

D'autre part, pour les prostates des chiens contrôles, les incubations de (5α) dihydrotestostérone en présence de NADPH amenaient une transformation de ce substrat en dihydroxy (5α) androstanes supérieure à celle observée pour leur biopsie.

.../...

TABLEAU 7

EFFET DU TRAITEMENT PAR L'ECP ET DE LA CASTRATION SUR LE METABOLISME DE LA TESTOSTERONE-4-^{14}C PAR DES BROYATS DE PROSTATE

TRAITEMENT	CHIEN N°	NADPH		SANS COFACTEURS		NAD+ & NADP+	
		AVANT	APRES	AVANT	APRES	AVANT	APRES
ECP	1	2,8	0,06	-	-	-	-
	2	6,4	0,09	-	0,09	-	0,08
	5	5,3	0,05	2,8	0,05	1,0	0,08
	11	§	0,02	§	0,07	§	0,08
CASTRATION	7	3,0	0,7	1,0	0,6	0,3	0,2
	9	3,0	0,9	1,7	0,2	0,5	0,2
CONTROLES	8	3,0	3,0	1,8	1,4	0,9	0,5
	10	2,7	2,4	2,3	0,6	1,7	0,4

Les résultats présentés correspondent au rapport des métabolites hydroxylés en 17β aux métabolites 17-cétoniques :

$$\frac{\text{(5α) dihydrotestostérone + (5α) androstanediols}}{\text{androstènedione + (5α) androstanedione}}$$

§ *La biopsie de la prostate du chien correspondant n'a pas été faite .*

TABLEAU 8

EFFET DU TRAITEMENT PAR L'ECP ET DE LA CASTRATION SUR LE METABOLISME DE LA (5α) DIHYDROTESTOSTERONE-4-^{14}C PAR DES BROYATS DE PROSTATE

TRAITEMENT	CHIEN N°	NADPH		SANS COFACTEURS	
		AVANT	APRES	AVANT	APRES
ECP	1	-	-	-	-
	2	-	0,2	-	-
	5	4,7	0,1	1,3	0,08
	11	§	0,1	§	0,03
CASTRATION	7	2,8	1,3	-	-
	9	8,0	1,6	-	-
CONTROLES	8	1,6	4,0	-	-
	10	4,0	8,0	-	-

Les résultats présentés correspondent au rapport des métabolites hydroxylés en 17β aux métabolites 17-cétoniques : $\frac{\text{(5α) androstanediols}}{\text{(5α) androstanedione}}$

§ *La biopsie du chien correspondant n'a pas été faite .*

Cette augmentation du métabolisme réductif pourrait être une expression de la régénération des tissus dans la prostate.

DISCUSSION DES RESULTATS

Le métabolisme de la testostérone-4-^{14}C se fait selon des voies métaboliques oxydatives et réductives (figure 7). La contribution relative de chacune de ces voies peut être exprimée par le rapport des stéroïdes 5α réduits et 17β-hydroxylés totaux aux stéroïdes 17-cétoniques totaux.

Lors de l'injection de testostérone-4-^{14}C dans la prostate du chien, nous avons obtenu un rapport moyen de 4,62 et prouvé la présence de dihydroxy-3α,17β (5α) androstane, de dihydroxy-3β,17β (5α) androstane, de (5α) dihydrotestostérone, d'androstérone, d'*épi*androstérone et de (5α) androstanedione.

Lors des expériences présentées dans ce chapitre, l'incubation de testostérone-4-^{14}C avec des broyats de prostate de chiens intacts, sans addition de cofacteurs exogènes, a donné des rapports s'étalant entre 1,0 et 2,8.

L'addition de NADPH aux incubations a porté les valeurs de ces rapports à 2,7 - 6,4 et a aussi augmenté le taux de métabolisme, permettant ainsi d'identifier la (5α) dihydrotestostérone, le dihydroxy-3β,17β (5α) androstane et le dihydroxy-3α,17β (5α) androstane en tant que métabolites principaux.

Nous pouvons d'après ces résultats noter que l'addition de NADPH est nécessaire pour reproduire *in vitro* le taux de métabolites caractérisé *in vivo*, et supposer que la préparation du broyat de prostate prive le tissu de la forme active du NADPH.

Dans les conditions d'incubation employées ici, la transformation de substrat exprimée en pmoles/100 mg de tissu/heure était plus élevée pour l'androstènedione (293 ± 24,2) que pour la (5α) dihydrotestostérone (225 ± 30,0) et que pour la testostérone (175± 17,8).

Seule la 17β oxydoréductase de la prostate du chien a été étudiée; KOCHAKIAN et ses collaborateurs (36,51) ont trouvé que cet enzyme, localisé dans la fraction microsomiale, pouvait être solubilisé avec du Triton X-100 ou du désoxycholate et détaché de l'ARN par la RNAse, et que son activité

.../...

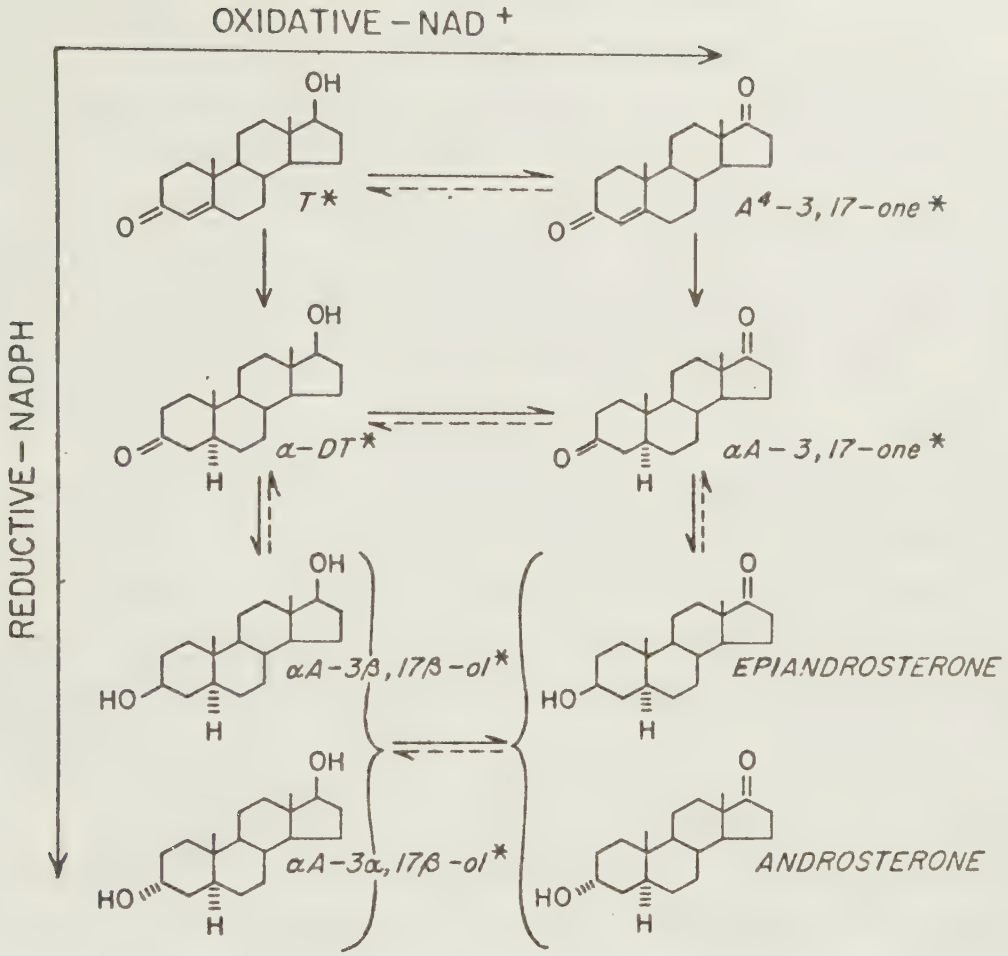


Figure 7

Métabolisme des stéroïdes en C-19 dans la prostate.

T = testostérone

Δ^4-3,17-ONE = androstènedione

α-DT = (5α) dihydrotestostérone

αA-3,17-ONE = (5α) androstanedione

αA-3β,17β-OL = dihydroxy-3β,17β (5α) androstane

αA-3α,17β-OL = dihydroxy-3α,17β (5α) androstane

* = stéroïdes ayant été identifiés par cristallisation à activité spécifique constante.

maximum était environ 3 fois plus grande avec NAD+.

L'activité de cet enzyme était déterminée à pH 9,6 et avec de très hautes concentrations de substrat ; dans ces conditions l'androstérone et la déhydro*épi*androstérone n'étaient pas métabolisées.

La 5α réductase a été mise en évidence dans la fraction nucléaire (7,27) mitochondriale et microsomale (17,52) de la prostate ventrale du rat. Chez l'homme, des spécimens de prostate atteinte d'hypertrophie bénigne présentaient une activité 5α réductasique au niveau des microsomes (5,43).

Les 3α et 3β oxydoréductases ont été mises en évidence dans le cytoplasme des cellules de la prostate humaine (5).

Ces enzymes sont utilisés au cours du métabolisme de la testostérone (figure 7) et il est raisonnable de penser que l'intégrité de la structure du noyau, du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi dans les cellules de la prostate sont nécessaires pour l'expression du métabolisme de la testostérone selon les voies métaboliques réductives et oxydatives dans un rapport normal.

L'administration d'ECP aux chiens a déterminé la métaplasie squameuse de l'épithélium prostatique. Ces altérations glandulaires étaient caractérisées à l'examen au microscope électronique par un changement de l'euchromatine nucléaire en hétérochromatine, une dilatation des espaces périnucléaires, une perte considérable du réticulum endoplasmique granuleux, la formation de grosses vacuoles bordées de ribosomes et une diminution de la densité en mitochondries.

Ces modifications de l'ultrastructure des cellules de l'épithélium prostatique étaient retrouvées chez les chiens castrés ; on notait cependant la présence de nombreux lysosomes et l'absence des vacuoles bordées de ribosomes observées chez les chiens traités par l'ECP.

Les changements introduits dans l'ultrastructure cellulaire de l'épithélium prostatique par les manipulations anti-androgéniques doivent être à l'origine des modifications observées dans le métabolisme de la testostérone.

Après administration d'ECP, le métabolisme de la testostérone et de la (5α) dihydrotestostérone dans la prostate était plus important que chez des chiens intacts, et le changement de la voie de métabolisme réductif normale en une voie de métabolisme oxydatif était observée.

.../...

Par contre, le métabolisme de l'androstènedione correspondait au tiers du niveau normal.

Le traitement par un estrogène a donc eu des effets opposés sur les quatre enzymes principaux impliqués dans le métabolisme des stéroïdes en C_{19} par la prostate (figure 10) : la 5α-réduction par la 5α réductase, et la réduction des 3-cétostéroïdes par les 3α et 3β oxydoréductases ont diminué considérablement : par contre la conversion des stéroïdes 17β-hydroxylés en 17-cétones par la 17β oxydoréductase a augmenté énormément, correspondant à la presque totalité du métabolisme du substrat par la prostate des chiens traités par l'ECP.

La validité des observations faites ici repose sur la comparaison directe des conversions enzymatiques dans les biopsies avec celles obtenues dans la même prostate après traitement.

SHIMIZAKI (17,52) et FARNSWORTH (53) ont noté que l'addition d'estrogènes naturels et synthétiques à des broyats et à des préparations subcellulaires de prostate humaine ou de rat inhibait l'expression de la 5α réductase dans ces tissus.

Nos travaux confirment ces résultats et complètent au niveau de l'organe cible ceux de MAUVAIS-JARVIS.

L'inhibition par les estrogènes du métabolisme de la testostérone selon une la voie réductive au profit de la voie oxydative a été démontrée chez l'homme (54,55) par administration de deux métabolites doublement marqués et extraction des produits terminaux communs dans les urines.

Les métabolites de la testostérone dans la prostate ; la (5α) dihydrotestostérone, le dihydroxy-3α,17β (5α) androstane et le dihydroxy-3β,17β (5α) androstane, peuvent avoir des rôles séparés mais complémentaires dans l'expression de l'activité androgénique au niveau de l'organe cible (13,25,43).

La (5α) dihydrotestostérone affecterait la transcription de l'ARN au niveau de l'ADN nucléaire, et les deux dihydroxy (5α) androstanes auraient une action au niveau de la synthèse des protéines dans le cytoplasme de la cellule.

Les altérations de l'ultrastructure cellulaire causées par l'estrogène doivent donc être corrélées avec l'inhibition des enzymes nucléaires et microsomaux causant la synthèse des "androgènes actifs" dans l'épithélium glandulaire.

.../...

Après injection intrapéritonéale de diéthylstilbestrol-^{3}H ou de la testostérone-^{3}H, MANGAN (56) a retrouvé dans les deux cas la radioactivité à des niveaux subcellulaires identiques dans la prostate de rats adultes.

Donc, l'inhibition de la 5α réductase et des 3α et 3β oxydoréductases peut être expliquée par des interactions allostériques avec l'estrogène, ou par le blocage par celui-ci des sites du substrat ou du cofacteur.

Ces deux suppositions sont fondées sur les travaux de YIELDING et TOMKINS (57) montrant la dissociation du tétramère de la déhydrogénase hépatique en unités inactives, favorisée par l'estradiol-17β ou le diéthylstibestrol, et sur les travaux de CRISS et McKERNS (58) qui ont mis en évidence le blocage du site NADP+ par l'estradiol-17β sur la glucose-6-phosphate déhydrogénase des surrénales de la vache.

L'inhibition décrite ne s'étend pas à la 17β oxydoréductase de la prostate. Au contraire les résultats présentés ici, bien que provenant d'incubations avec une seule concentration de substrat, suggérent une stimulation par l'estrogène de l'activité enzymatique.

Les broyats de tissus provenant de chiens traités par l'ECP, incubés en présence de NAD+ et de NADP+, transformaient 3,5 fois plus de testostérone en androstènedione et (5α) androstanedione que les biopsies de prostates de chiens intacts.

Cependant la quantité des métabolites 17β-hydroxylés était réduite de moitié par rapport au taux normal. L'addition de NADPH ne parvenait pas à changer cette diversion de la voie métabolique réductive de la testostérone.

L'augmentation de la production des stéroïdes 17-cétoniques serait donc le fait d'un accroissement de l'activité enzymatique plutôt que celui de l'inhibition de l'activité de la 5α réductase seule.

Cet effet de stimulation de la 17β oxydoréductase pourrait être une expression des modifications structurales induites par l'ECP au niveau des vacuoles bordées de ribosomes observées dans les cellules de prostate des chiens traités.

Des changements dans la structure de la 17β oxydoréductase, ou sa libération dans le cytoplasme sous l'action d'enzymes protéolitiques (51) pourraient aussi expliquer l'augmentation de son activité.

.../...

Une inhibition analogue par les estrogènes des 5α/5β réductases hépatiques des stéroïdes en C_{21}, avec changement vers une voie métabolique oxydative, expliquent l'augmentation de l'excrétion de l'hydroxy-6α cortisol au cours de la grossesse chez la femme (59).

Le changement de voie métabolique observé ici détermine le remplacement des stéroïdes 17β hydroxylés ((5α) dihydrotestostérone, dihydroxy-3β,17β (5α) androstane,dihydroxy-3α,17β (5α) androstane) par un stéroïde à potentialité androgénique faible, l'androstènedione.

Ce changement de voie métabolique de la testostérone peut être corrélé à un processus de dédifférenciation; la vessie possède une origine embryonnaire identique à celle de la prostate et présente cependant une voie de métabolisme oxydative de la testostérone (38).

Si la présence d'une voie de métabolisme réductive de la testostérone dans la prostate est le fait d'une différenciation plus poussée de cet organe en tant qu'organe cible, l'action contraire de l'ECP sur ce métabolisme l'assimilerait à un tissu non différencié.

Sous plusieurs aspects, les effets du traitement par l'ECP et de la castration ont été similaires. Dans les deux cas, les hypophyses des chiens traités contenaient des cellules acidophiles rouges. Ceci confirme les résultats de PURVES et GRIESBACH (60) qui ont observé un accroissement des acidophiles rouges dans l'hypophyse de jeunes animaux traités au diéthylstibestrol.

Ces changements dans la morphologie pituitaire après les manipulations endocrines indiqueraient à la fois la stimulation de la synthèse et l'accumulation de la prolactine dans les cellules pituitaires avec un effet secondaire sur la structure et la fonction de la prostate (61).

Chez les chiens castrés et chez les chiens traités par l'ECP, l'ultrastructure nucléaire présentait des quantités importantes d'hétérochromatine et des espaces périnucléaires élargis.

La transformation de l'euchromatine normale en hétérochromatine montre que le génome a été affecté et que la transcription ne se fait plus (62).

Les travaux et les théories récentes relatives au mode d'action des androgènes sur la synthèse de l'ARN par le noyau ont été exposés et critiqués par LIAO et FANG (63).

Les travaux de MANGAN ont démontré que l'implantation de doses

.../...

de stibestrol chez les rats mâles entraînait des modifications dans le métabolisme des acides nucléiques et des protéines, semblables à celles induites par la castration.

Chez les chiens castrés le changement de la voie métabolique réductive de la testostérone en une voie métabolique oxydative s'est présenté comme dans les prostates de chiens traités par l'ECP.

L'androstènedione était également dans ce cas le métabolite principal après incubations *in vitro*. Il y avait cependant des différences importantes dans le métabolisme des stéroïdes en C_{19} par les prostates de chiens castrés et celles d'animaux traités pendant 4 semaines par de l'ECP.

L'addition de NADPH aux incubations de broyats de prostates de chiens castrés permettait à la 5α réduction de retourner partiellement au niveau normal ; ceci n'était pas observé dans les tissus provenant de chiens traités par l'ECP.

La castration semble donc décroître à la fois de l'apoenzyme et le cofacteur nécessaires à la 5α réduction.

D'autre part et contrairement au traitement par l'ECP, la castration avait peu d'effet sur le métabolisme de la (5α) dihydrotestostérone par les 3α et 3β oxydoréductases.

De plus la quantité de testostérone métabolisée différait peu de la normale après castration, et l'augmentation importante de l'activité de la 17β oxydoréductase induite par le traitement à l'ECP n'était pas observée.

Cependant l'activité de cette enzyme était conservée dans la prostate des chiens castrés où elle était probablement détachée du réticulum endoplasmique granuleux au cours de la protéolyse lysomale ; la formation de stéroïdes 17-cétoniques correspondait à la diminution de la réduction en 5α du substrat.

Cette diminution de la réduction en 5α de la testostérone et de l'androstènedione dans la prostate des chiens castrés coïncide avec les résultats publiés par SHIMIZAKI (64) ; cet auteur a montré que la castration déterminait dans la prostate ventrale du rat une diminution de la réduction en 5α de la testostérone et que l'administration de cette hormone à l'animal castré restaurait l'activité enzymatique à son niveau normal.

Il reste à savoir pourquoi les 3α et 3β oxydoréductases dans les broyats de prostate de chiens castrés s'expriment de la même façon

.../...

que chez les chiens intacts, bien que l'atrophie des glandes soit visible au microscope optique et que l'altération des ultrastructures nucléaires et endoplasmiques soient évidentes au microscope électronique.

Il se pourrait que pendant le mois suivant la castration les surrénales aient produit un taux d'androstènedione suffisant pour compenser la perte des androgènes testiculaires (65).

Des études cinétiques du métabolisme des stéroïdes en C_{19} seront nécessaire pour corréler les variations des métabolismes par les quatre enzymes décrits (figure 7) avec les modifications de l'ultrastructure cellulaire des prostates de chiens castrés et de chiens traités par l'ECP.

L'évaluation des contributions relatives des voies métaboliques oxydatives et réductives de la testostérone dans les broyats de biopsie de la prostate peut être un moyen utile d'étudier la sensibilité des organes cibles aux androgènes et aux estrogènes circulant dans l'organisme.

.../...

CHAPITRE III

METABOLISME *IN VIVO* DE STEROIDES EN C-19 PAR L'HYPERPLASIE BENIGNE ET L'ADENOCARCINOME DE LA PROSTATE HUMAINE ET PAR LA PROSTATE DU CHIEN

INTRODUCTION

L'injection lente d'une hormone radioactive dans le sang artériel afférent à la prostate permet aux différents facteurs qui influencent sa pénétration et son métabolisme *in situ* de s'exprimer d'une façon plus physiologique que ne le permettent les expériences *in vitro*.

Ainsi, la liaison de l'hormone avec les protéines sériques peut s'effectuer, le mécanisme de pénétration dans la membrane cellulaire a lieu, et les concentrations relatives des cofacteurs sous forme oxydée ou réduite dans la cellule vivante peuvent influencer le métabolisme intracellulaire de l'hormone.

Nous avons injecté de la testostérone-4-^{14}C à des chiens normaux (chapitre 1). Nous avons voulu poursuivre cette série d'expériences en utilisant l'androstènedione-4-^{14}C et tenter ces injections sur des prostates de sujets humains subissant une prostatectomie totale ou partielle.

La testostérone est transformée en (5α) dihydrotestostérone dans la prostate et les autres organes sexuels secondaires. Ce métabolite est retenu dans le noyau cellulaire des prostates de rat (7).

Les calculs de l'exposition des organes sexuels secondaires aux radiations a été basé sur l'interprétation des résultats chez le rat puisqu'il n'y a pas de travaux publiés sur la cinétique de rétention de la (5α) dihydrotestostérone dans la prostate humaine.

Les calculs ont été soumis au "Human Use Comittee, Peter Bent Brigham Hospital, Boston, USA" afin d'obtenir l'autorisation d'expérimenter sur l'homme au cours des opérations chirurgicales conduites dans cet hôpital.

BUTENANDT et Collaborateurs (66) ont montré que les vésicules séminales de jeunes rats retenaient très peu de radioactivité 15 heures après inonction de la peau abdominale par une solution alcoolique de testostérone-4-^{14}C.

MAUVAIS-JARVIS et Collaborateurs (32) ont montré chez l'homme que cette inonction administrait l'hormone aux organes cibles en court-circuitant l'inactivation due au passage par le foie.

TVETER et UNHJEN (40) ont étudié la rétention de la testostérone-1,2-^{3}H administrée par voie intramusculaire au niveau des vésicules séminales du rat castré. Ils ont montré que peu de radioactivité était retenue 16 heures après l'injection de l'hormone.

.../...

BRUCHOVSKY et WILSON (7) ont montré que la (5α) dihydrotestostérone était retenue par le cytoplasme et le noyau cellulaire de la prostate du rat normal et hépatectomisé pendant deux heures après injection intraveineuse de testostérone-1,2-^{3}H.

La radioactivité retenue dans la prostate 24 heures après l'administration hormonale était négligeable (67). Les expériences proposées chez l'homme prévoyaient l'administration d'une dose traceuse de 10 µC de testostérone-4-^{14}C.

En fixant à 3 heures le temps de demie-vie de cette radioactivité circulerait chez l'homme de 70 kg, on calculait que l'exposition serait de $6,5.10^{-5}$ rads, et en fixant à 24 heures la rétention plausible de 0,5 µC par 20 g de tissu cible, on calculait que l'exposition serait de $9,2.10^{-2}$ rads.

Les résultats des travaux décrits ici ont été présentés au "Third Tenovus Workshop" Cardiff, Grande-Bretagne (P. OFNER, R.F. MORFIN, R.L. VENA et M. A. ALIAPOULIOS, Third Tenovus Workshop Proceedings (1970) sous presse, Giffiths K., et Pierrepoint éditeurs) et au "Third International Congress on Hormonal Steroids" à Hambourg, Allemagne Fédérale (R.F. MORFIN, M.A. ALIAPOULIOS, A.H. BENNETT, J.H. HARRISON et P. OFNER, septembre 1970) sous presse et abstract n° 39.

METHODES

TECHNIQUE UTILISEE POUR L'INJECTION DE TESTOSTERONE-4-^{14}C DANS LA PROSTATE HUMAINE

Les injections ont été effectuées sur deux sujets au cours de l'ablation de leur prostate.

Le premier malade âgé de 70 ans était atteint d'un adénocarcinome de la prostate.

Au cours de l'opération une solution de testostérone-4-^{14}C (49 µg, 10 µC) dans 80 ml de sérum physiologique à 2,5 % d'éthanol était injectée simultanément dans les deux artères hypogastriques avec des seringues de 40 ml (figure 8).

L'injection durait 10 minutes. Au bout de ce temps là, la prostatectomie était effectuée par voie rétropubique. Le tissu, dont 30 % étaient

.../....

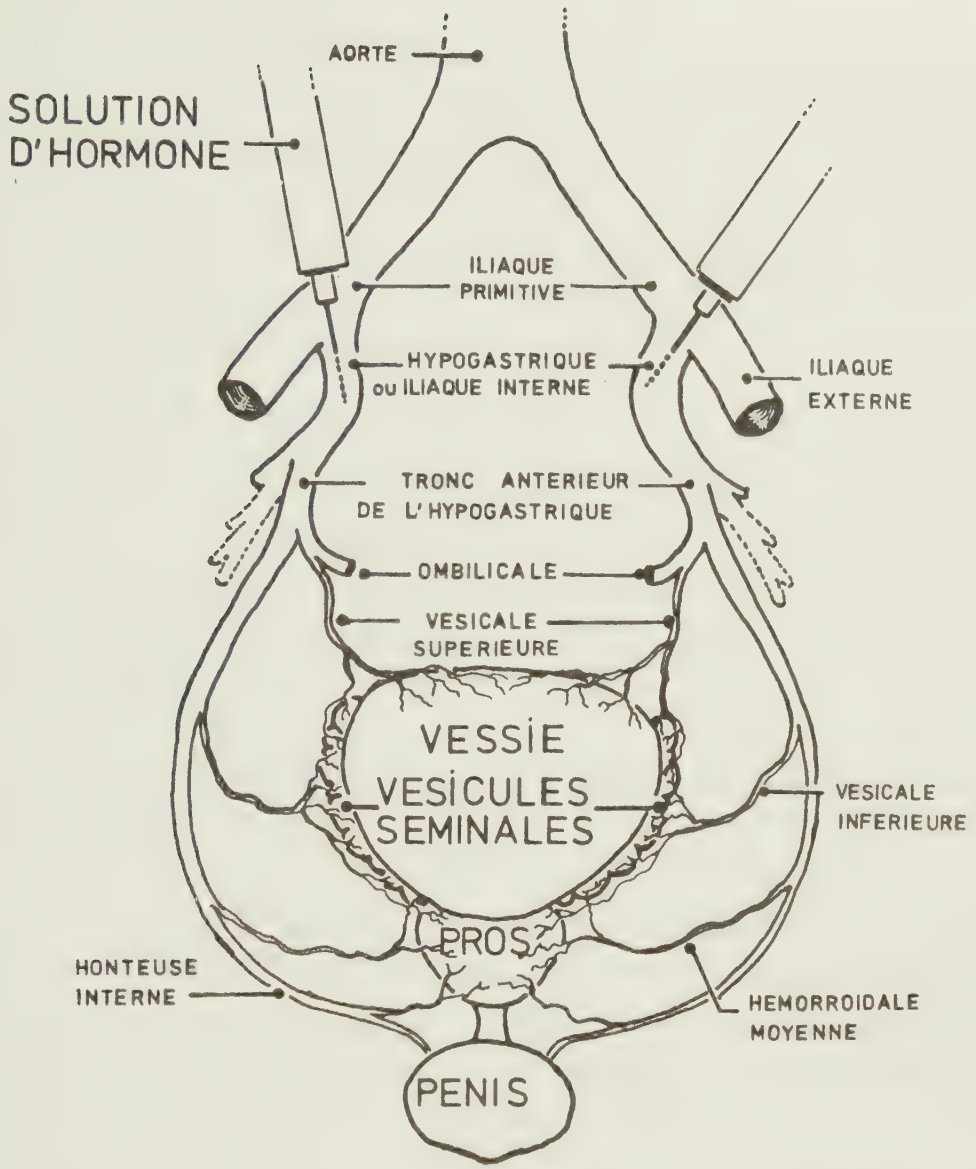


Figure 8

Représentation schématique de la méthode employée pour l'injection de testostérone radioactive au cours d'une opération de prostatectomie chez l'homme.

retenus pour les examens pathologiques, était coupé en morceaux sur de la glace pilée et plongée dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'acétone (1 : 1) 23 minutes après la fin de l'injection.

Le deuxième malade, âgé de 72 ans était atteint d'une hyperplasie bénigne de la prostate. Une solution de testostérone-4-^{14}C (48 µg, 9,8 µC) était injectée de la même façon (figure 8)pendant 10 minutes au cours de l'opération chirurgicale.

Avant l'ablation de la glande, 10 ml de sang veineux étaient prélevés à la saignée du coude. Le tissu prélevé par la voie rétropubique était coupé en morceaux et plongé dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'acétone (1 : 1) 18,5 minutes après la fin de la perfusion.

Les examens histologiques retenaient 30 % du tissu frais. Le tissu était maintenu sur glace pilée dés son prélèvement et jusqu'à sa mise sous solvants.

TECHNIQUE UTILISEE POUR L'INJECTION D'ANDROSTENEDIONE-4-^{14}C DANS LA PROSTATE CANINE

Les techniques de perfusion de la prostate chez le chien par de la testostérone-4-^{14}C ont été décrites dans le chapitre I. Ces techniques n'ont pas été modifiées pour l'injection pendant 10 minutes d'androstènedione-4-^{14}C (56 µg, 9,9 µC en solution dans du sérum physiologique) dans le sang artériel afférent à la prostate d'un chien.

EXTRACTION, PURIFICATION ET IDENTIFICATION DES RADIOMETABOLITES

a) *Extraction et délipidation*

Les méthodes utilisées pour l'extraction des stéroïdes radioactifs dans les tissus et pour la délipidation des extraits obtenus sont décrites dans le chapitre I.

b) *Purification et identification des radiométabolites*

L'extrait contenant les radiométabolites était soumis à la CCM. Les métabolites séparés sur silice G dans le système n°8, ensuite sur alumine G dans le système n°7, étaient élués du gel et identifiés par dilution isotopique et cristallisation à activité spécifique constante.

.../...

Lorsque la quantité de radioactivité extraite était trop peu importante, la distribution des différents radiométabolites était déterminée de la façon suivante :

Des stéroïdes authentiques non radioactifs étaient ajoutés à l'extrait, et séparés par CCM sur silice G dans le sytème n°8. La plaque était révélée par pulvérisation d'acide sulfurique-éthanolique (1 : 1) et chauffage à 110°C, et les zones colorées grattées individuellement dans des fioles et comptées

RESULTATS

INJECTION DE TESTOSTERONE-4-^{14}C : PROSTATE CANINE

Les résultats obtenus après injection de testostérone-4-^{14}C dans les artères afférentes à la prostate sont présentés dans le chapitre I.

En résumé, seule l'hormone radioactive a été retrouvée dans le sang de la veine cave inférieure 2 minutes après le commencement de l'injection et jusqu'au sacrifice de l'animal 2 minutes plus tard.

Les taux de radioactivité retrouvés dans les prostates s'étalaient entre 0,9 et 3,0 % de la testostérone injectée.

Le métabolisme de la testostérone dans la prostate utilisée était important et comprenait une majorité de stéroïdes réduits en 5α . Les composés hydroxylés en 3β prédominaient sur les épimères en 3α. La moitié de la radioactivité retrouvée dans la prostate était associée à deux métabolites principaux : la (5α) dihydrotestostérone et le dihydroxy-3β,17β (5α) androstane (tableau 9).

INJECTION D'ANDROSTENEDIONE-4-^{14}C : PROSTATE CANINE

Après injection de l'androstènedione-4-^{14}C dans les artères afférentes de la prostate, 3,3 % de la radioactivité injectée ont été retrouvés dans cette glande.

Seule de l'androstènedione radioactive a été retrouvée dans le sang veineux à la mort de l'animal.

L'analyse de l'extrait par CCM a montré que la transformation du substrat était presque complète (94,88 % de l'androstènedione étaient

.../...

métabolisés) et que 2 zones importantes correspondant respectivement avec l'*épi*androstérone et la (5α) androstanedione étaient présentes (tableau 9)

Deux composés radioactifs inconnus étaient observés ; l'un correspondait à celui décrit lors des injections de testostérone-4-^{14}C (chapitre I), mais en plus petite quantité, l'autre moins polaire que la (5α) androstanedione correspondait à 9,3 % de la radioactivité totale extraite.

Identification de l'épiandrostérone

La présence de l'*épi*androstérone en tant que métabolite principal a nécessité une modification du procédé d'isolation utilisé (chapitre I).

Après CCM sur silice G dans le système n°8, la zone contenant l'*épi*androstérone contaminée par de la (5α) dihydrotestostérone et de l'androstérone était éluée et rechromatographiée en CCM bidimensionelle sur silice G avec le même système n°8.

L'*épi*androstérone éluée séparée de la (5α) dihydrotestostérone était soumise à un CCM sur alumine G dans le système n°7 afin d'éliminer l'androstérone.

Après ces étapes de purification, le stéroïde radioactif élué était additionné d'*épi*androstérone pure non radioactive. Une activité spécifique de 1085 dpm/µmole était atteinte.

Deux cristallisations successives ont permis d'atteindre une activité spécifique constante de 1050 dpm/µmole (figure 9).

Identification de la (5α) androstanedione

La (5α) androstanedione était éluée du gel après purification par CCM sur silice G dans le système n°8. De la (5α) androstanedione pure non radioactive était ajoutée à l'éluat, et une activité spécifique de 1 130 dpm/µmole était obtenue.

Après deux cristallisations successives, une activité spécifique constante de 1 085 dpm/µmole était atteinte (figure 9).

HYPERTROPHIE BENIGNE DE PROSTATE HUMAINE

Après injection de testostérone-4-^{14}C dans les artères hypogastriques afférentes à la prostate, 0,24 % de la radioactivité injectée était retrouvé dans la glande.

.../...

La radioactivité présente dans le sang veineux du sujet à la fin de l'injection a permis de calculer que 0,61 µC étaient présents à ce moment dans le sang de l'individu. Seule la testostérone radioactive était retrouvée dans ce sang veineux.

L'analyse par CCM a montré que dans l'hypertrophie bénigne de prostate obtenue, la transformation de la testostérone était presque complète (96,3 %).

Les composés inconnus décrits chez le chien n'étaient pas mis en évidence en quantité importante chez l'homme (0,2 % du composé inconnu plus polaire que la (5α) androstanedione), (voir tableau 9).

Les métabolites principaux de la testostérone-4-^{14}C étaient la (5α) dihydrotestostérone, le dihydroxy-3α,17β (5α) androstane et le dihydroxy-3β,17β (5α) androstane. Ces trois métabolites correspondaient à 84,2 % de la radioactivité retrouvée dans la glande (tableau 9).

Identification de la (5α) dihydrotestostérone

La (5α) dihydrotestostérone radioactive était éluée du gel après CCM sur alumine G dans le système n°7. De la (5α) dihydrotestostérone pure et non radioactive était ajoutée à l'éluat.

Une activité spécifique de 338 dpm/µmole était obtenue. Une activité spécifique constante de 373 dpm/µmole était atteinte après deux cristallisations sucessives de la (5α) dihydrotestostérone.

Identification du dihydroxy-3α,17β (5α) androstane

Le dihydroxy-3α,17β (5α) androstane-4-^{14}C était élué du gel après CCM sur alumine G dans le système n°5. Du dihydroxy-3α,17β (5α) androstane pur non radioactif (12,6 µmoles) était ajouté à l'éluat.

Après dilution isotopique, l'activité spécifique était de 160 dpm/µmole. Deux cristallisations seulement ont été possibles. Du fait des quantités minimes sur lesquelles ces cristallisations étaient effectuées, le poids du soluté dans les eaux-mères ne pouvait être mesuré très précisément et l'activité spécifique de ces dernières s'écartait de celle des cristaux (figure 9).

L'activité spécifique des cristaux pouvait être mesurée assez précisément et l'on notait qu'elle restait constante à 160 dpm/µmole au cours des deux cristallisations successives (figure 9).

.../...

TABLEAU 9

METABOLITES RADIOACTIFS OBTENUS APRES INJECTION DE STEROIDES MARQUES AU CARBONE-14 DANS DES PROSTATES HUMAINES ET CANINES

TISSUS	PROSTATE HYPERPLASIQUE HUMAINE	PROSTATE CANCEREUSE HUMAINE	PROSTATE NORMALE CANINE	PROSTATE NORMALE CANINE
STEROIDE INJECTE	TESTOSTERONE	TESTOSTERONE	TESTOSTERONE	ANDROSTENEDIONE
Métabolites polaires	4,0	5,7	3,5	4,5
Dihydroxy-3β,17β (5α) androstane	8,9 †	3,6	11,7 †	1,9
Dihydroxy-3α,17β (5α) androstane	12,6 †	5,8	1,9 †	
Testostérone	3,7	21,1	19,4 †	1,1
Androstérone	2,3	3,4	2,0 †	6,5
*Epi*androstérone	-	-	6,7 †	32,7 †
(5α) dihydrotestostérone	62,7 †	53,0	38,4 †	5,1 †
Inconnu	-	0,8	7,4	0,9
Androstènedione	2,8	0,9	1,2	5,3
(5α)androstanedione	2,8	5,7	7,6 †	32,6 †
Inconnu	0,2	-	-	9,3

† *Métabolite identifié par cristallisation à activité spécifique constante.*
Les résultats sont exprimés en pourcentages de la radioactivité extraite des tissus .

Identification du dihydroxy-3β,17β (5α) androstane

Le dihydroxy-3β,17β (5α) androstane-4-^{14}C était élué du gel après CCM sur alumine dans le système n°5. Du fait de la quantité peu élevée de radioactivité présente, une quantité faible de dihydroxy-3β,17β (5α) androstane pur non radioactif (12,0 µmoles) était ajoutée à l'éluat, amenant l'activité spécifique de la solution à 120 dpm/µmole.

Deux cristallisations seulement ont été effectuées. Ces deux cristallisations ont permis d'atteindre une activité spécifique constante pour les cristaux de 105 dpm/µmole (figure 9).

La chute de l'activité spécifique pouvait correspondre à la présence contaminante de dihydroxy-3α,17β (5α) androstane-4-^{14}C dans l'éluat.

L'activité spécifique des eaux-mères restait élevée de ce fait et à cause du poids minime de soluté qu'elles contenaient.

ADENOCARCINOME DE LA PROSTATE HUMAINE

Après injection de testostérone-4-^{14}C dans les artères hypogastriques afférentes à la prostate, 0,06 % seulement de la radioactivité injectée était retrouvé dans cette glande.

Ce résultat est du même ordre que ceux trouvés par GELLER et BARON (107).

La quantité de radioactivité étant trop faible, il n'était pas possible d'identifier formellement les produits de transformation de la testostérone. On pouvait cependant, en se basant sur les expériences antérieures, déterminer quantitativement la contribution de chaque composé radioactif à la radioactivité totale en comparant leur mobilité chromatographique avec celle de composés authentiques non radioactifs.

Le procédé utilisé a été décrit dans les méthodes de ce chapitre. Les résultats obtenus par comptage des zones après CCM sur silice G dans le système n°8 sont exposés dans le tableau 9.

.../...

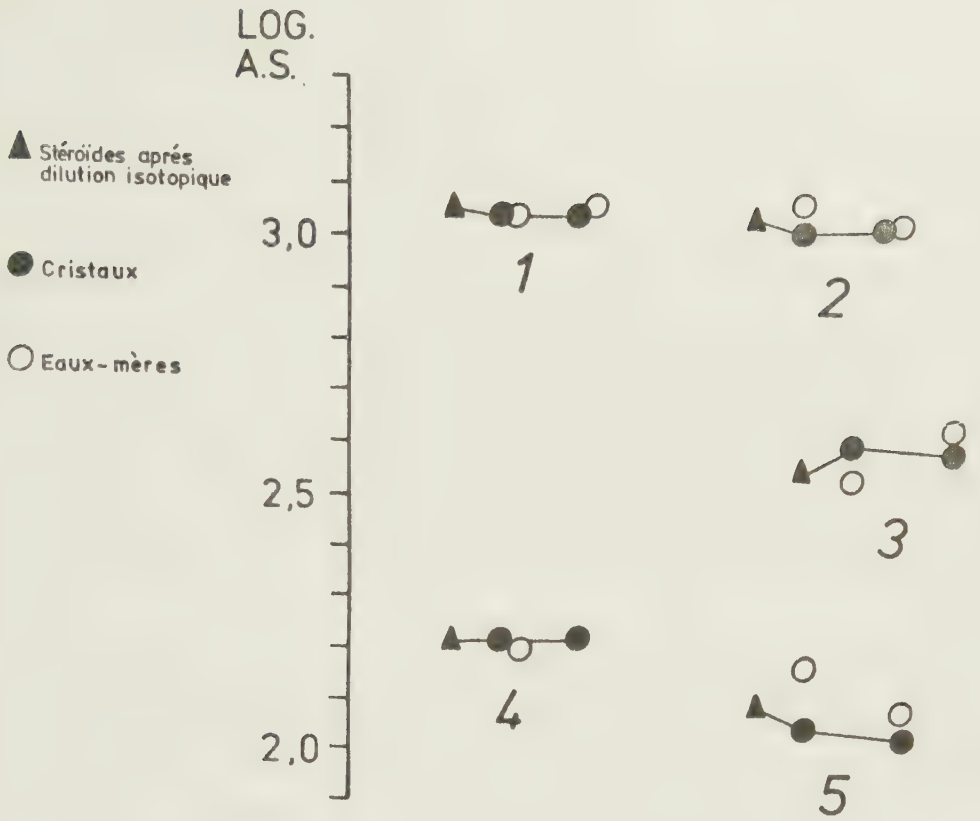


Figure 9

Cristallisation des radiométabolites à activité spécifique constante

1 - (5α) androstanedione (prostate canine/androstènedione)
2 - *épi*androstérone (prostate canine/androstènedione)
3 - (5α) dihydrotestostérone (prostate humaine/testostérone)
4 - dihydroxy-3α,17β (5α) androstane (prostate humaine/testostérone)
5 - dihydroxy-3β,17β (5α) androstane (prostate humaine/testostérone)

Les systèmes de solvants utilisés étaient dans tous les cas :
Acétate d'éthyle/n-hexane pour la première cristallisation,
Acétone/n-hexane pour la deuxième

DISCUSSION

Les résultats présentés dans ce chapitre permettent une étude comparative du métabolisme de la testostérone-4-^{14}C par la prostate du chien normal et par des tissus pathologiques humains de même origine.

Les métabolites radioactifs isolés dans ces organes indiquent la présence assertorique d'enzymes métabolisant la testostérone.

Leur identification a permis de reconnaître la 5α réductase, la 17β oxydoréductase, la 3α oxydoréductase et la 3β oxydoréductase. Ces enzymes métabolisant la testostérone admettent aussi comme substrat l'androstènedione.

L'expérience avec cette hormone sur le chien a démontré l'action de ces enzymes par la production de métabolites différents de ceux biosynthétisés à partir de la testostérone. Les résultats obtenus peuvent être comparés dans le tableau 9.

La contribution relative de chaque métabolite au spectre d'action de chaque enzyme est présentée dans le tableau 10. On y remarque que dans tous les cas la 5α réduction prédomine. Ceci suggère que cette étape enzymatique est nécessaire à l'expression des autres activités enzymatiques.

La 17β oxydoréduction de la testostérone est plus importante chez le chien que dans les tissus humains. Cependant elle est de moitié chez cet animal lorsque l'androstènedione est injectée.

Ceci suggère que les cofacteurs contenus dans l'organe nécessaires à la 17β oxydoréduction prédominent sous une forme réduite , ou bien que le cofacteur oxydé n'est pas présent sous la forme voulue.

Ces résultats corrèlent les observations faites dans le chapitre II sur les incubations de broyats de prostate canine et les travaux de HUSSEIN et KOCHAKIAN (36) selon lesquels le NAD+/NADH serait le cofacteur nécessaire à la 17β oxydoréduction.

Dans ce cas particulier, il pourrait y avoir un manque de NADH dans le tissu *in vivo*. Cette supposition est également basée sur les travaux de GLOCK et McLEAN (68) sur la prostate du rat dans laquelle les formes prédominantes de cofacteurs sont NADPH et NAD+ *in vivo*.

L'oxydoréduction en 3α et en 3β se manifeste chez l'homme et chez le chien par des quantités relatives des dihydroxy (5α) androstanes

.../...

TABLEAU 10

INJECTION DE STEROIDES MARQUES AU CARBONE-14 DANS DES PROSTATES HUMAINES ET CANINES

TISSUS	PROSTATE HYPERPLASTIQUE HUMAINE	PROSTATE CANCEREUSE HUMAINE	PROSTATE NORMALE CANINE	PROSTATE NORMALE CANINE
STEROIDE INJECTE	TESTOSTERONE	TESTOSTERONE	TESTOSTERONE	ANDROSTENEDIONE
5α-REDUCTION †	89,3	71,5	68,3	78,7
17β-OXIDOREDUCTION †	7,9	10,0	17,5	8,1
3α-OXIDOREDUCTION †	12,6	5,8	1,9	6,5
3β-OXIDOREDUCTION †	8,9	3,4	11,7	32,7
3α / 3β	1,41	1,70	0,16	0,20
STEROIDES 17β HYDROXYLES †	84,2	62,4	52,0	8,1
STEROIDES 17 CETONIQUES †	7,9	10,0	17,5	71,7
17β-OH / 17 CETONES	10,65	6,24	2,97	0,11

† *Exprimés en pourcentage de la radioactivité extraite des tissus .*

épimériques. L'oxydoréduction en 3α est prépondérante chez l'homme. L'inverse est observé chez le chien, même lorsque l'androstènedione est utilisée comme substrat.

Cette différence exprimée par le rapport 3α/3β dans le tableau 10 pourrait exprimer une localisation différente de ces enzymes dans les cellules des prostates de chacune des deux espèces, et de par cela un rôle différent dans l'excrétion ou l'expression androgénique des diols.

On notera que chez l'homme l'épimère 3α seul a été mis en évidence comme produit d'excrétion dans les urines (8,69,70). Son abondance relative dans la prostate laisserait supposer qu'il est éliminé et excrété après glucuronidation dans le foie.

D'un autre côté, le dihydroxy-3β,17β (5α) androstane seul et non son épimère en 3α maintient la sécrétion et la structure des cellules épithéliales de la prostate de rat en culture d'organe (13).

Des expériences ultérieures (chapitre IV) nous ont montré que la prostate ventrale du rat produisait environ 10 fois plus de dihydroxy-3α, 17β (5α) androstane que d'épimère en 3β lors du métabolisme *in vitro* de la testostérone et de la (5α) dihydrotestostérone.

L'abondance du dihydroxy-3α,17β (5α) androstane chez l'homme comme chez le rat laisse supposer que ce métabolite est un produit terminal du métabolisme, voué à l'excrétion.

Par contre, la rareté relative du dihydroxy-3β,17β (5α) androstane, son taux très bas dans les urines humaines, et son action sur les cultures de tissu de prostate permettent de penser que ce métabolite est un produit intervenant dans l'expression androgénique de la testostérone.

Chez le chien, les épimères 3β-hydroxylés dominent (tableau 10). La littérature ne contient pas de références exposant quel est le diol excrété dans les urines du chien. Il semblerait que cette différence nette avec les tissus humains puisse se poursuivre au niveau de l'excrétion et que les formes excrétées et actives soient opposées dans ces deux espèces.

Cet argument est plausible car il existe une autre expèce chez laquelle une telle différence existe. Chez le chapon, l'application locale de dihydroxy-3α,17β (5α) androstane détermine une réponse 5 fois supérieure à l'application de l'épimère en 3β.

Lors d'injection de dihydroxy-3α,17β (5α) androstane, la réponse de la crête était 25 fois supérieure à celle induite par l'injection de

.../...

l'épimère en 3β (71). Ceci amène à penser que contrairement au cas de l'homme et du rat, chez le chapon le composé 3α-hydroxylé est actif alors que le composé 3β-hydroxylés l'est bien moins et est rapidement éliminé après son injection.

Ces spéculations tentent de suggérer que les métabolites de la testostérone : la (5α) dihydrotestostérone et le dihydroxy-3α,17β (5α) androstane pourraient avoir des rôles séparés mais complémentaires dans l'expression de l'activité androgénique au niveau de la prostate et plus généralement des organes cibles chez le chien.

La (5α) dihydrotestostérone serait active au niveau de la transcription de l'ARN sur l'ADN nucléaire, le "diol actif" contrôlerait la synthèse des protéines au niveau de l'ARN des microsomes.

Chez l'homme comme chez le chien, la testostérone, précurseur des métabolites actifs, est transformée selon une voie métabolique réductive.

Les stéroïdes 17β-hydroxylés formés à partir de la testostérone permettraient une mesure de l'activité androgénique présente dans le tissu.

BAULIEU et MAUVAIS-JARVIS (33) ont montré que les stéroïdes hydroxylés en 17β des urines humaines correspondaient à la différenciation sexuelle mâle des sujets.

Il est remarquable après ces observations de noter qu'une hormone circulante androgéniquement active telle que la testostérone, donne naissance à des composés 17β-hydroxylés (tableau 10) dans un rapport 10 fois supérieur à celui des composés 17-cétoniques ; alors qu'une hormone circulante androgéniquement peu active telle que l'androstènedione, donne naissance à des composés 17β-hydroxylés dans un rapport 10 fois inférieur à celui des composés 17-cétoniques.

L'androstènedione subit cependant la 5α réduction à un taux voisin de celui de la testostérone.

Les urines de 24 heures éliminées par les sujets opérés ont été recueillies pendant 5 jours et comptées.

Au premier jour, 50,2 % de la radioactivité administrée étaient retrouvés dans les urines ; par la suite, 6,5, 5,5, 4,5 et 4,3 % respectivement étaient récupérés dans les urines de 24 heures des jours suivants.

On remarquera que la demie vie de la testostérone administrée par voie intra-artérielle est similaire à celle de l'hormone radioactive administrée par inonction et qu'elle est bien plus importante que par la

.../...

voie intra veineuse (32).

On notera cependant que 29 % de la radioactivité sont retenus 5 jours après l'injection du produit marqué.

CHAPITRE IV

METABOLISME *IN VITRO* DE STEROIDES EN C_{19} PAR DES PREPARATIONS DE PROSTATES HUMAINES ET CANINES

.../...

INTRODUCTION

Le métabolisme de la testostérone *in vitro* par des préparations de prostate humaine a été exploré par de nombreux auteurs. Les résultats exposés (5,16,72,73,74,75,76) ont présenté des différences considérables quant à l'identité des métabolites formés et aux quantités de substrat métabolisées.

Ces travaux n'ont pas permis d'effectuer des comparaisons entre des tissus identiques provenant d'individus différents, car sous leur forme explorationelle ils n'apportaient pas les éléments nécessaires à la mesure d'activités enzymatiques.

Nous avons taché de compléter l'exploration du métabolisme de la testostérone dans les hyperplasies bénignes de prostate humaine, les prostates de chien et de rat.

Nous avons voulu d'autre part, en étudiant les cinétiques enzymatiques dans les tissus humains et canins, comparer leurs activités.

Les résultats obtenus par les expériences *in vivo* (chapitre I et III) ont donné des informations précieuses sur le métabolisme de la testostérone dans ces tissus.

L'étude de l'ultrastructure des prostates canines et des modifications de celle-ci à la suite de manipulations antiandrogéniques (chapitre II) a permis de soupçonner la localisation intracellulaire de certains enzymes métabolisant les androgènes.

La recherche *in vitro* des activités de ces enzymes dans des fractions subcellulaires devrait permettre de les situer plus précisément et d'étudier leurs propriétés et leurs besoins en cofacteurs.

Le travail sur des préparations de tissus a nécessité des contrôles constants. La collection et la préparation des tissus devait se faire dans des délais et à des températures qui puissent éviter leur dénaturation.

Les résultats obtenus avec des homogénats devaient être contrôlés par ceux obtenus avec des broyats des mêmes glandes de façon à reconnaître les dénaturations possibles dues à l'homogénisation.

Les méthodes d'obtention des organelles subcellulaires ont du être étudiées et modifiées en fonction des résultats préliminaires obtenus et en tenant compte des travaux de CHAMBERLAIN (5) et de HUSSEIN et KOCHAKIAN (36).

.../ ...

Les quantités de substrat utilisées pour les incubations ont été calculées de façon à être de l'ordre de celles présentes *in vivo*, et la contamination possible de ces incubations par des bactéries exogènes contrôlée par des tests bactériologiques (5).

Enfin, les résultats obtenus devaient permettre,en relation avec des travaux récents (6,12,13,31,33,37,41), de discuter la formation de métabolites androgéniquement actifs.

Les travaux décrits dans ce chapitre ont été présentés au "Third Tenovus Wokshop" Cardiff, Grande Bretagne (P. OFNER, R.F. MORFIN, R.L. VENA et M.A. ALIAPOULIOS au Third Tenovus Wokshop Proceedings (1970, (sous presse) Griffiths K, et Pierrepoint éditeurs) et au "Third international Congress on Hormonal Steroids" à Hambourg, Allemagne Fédérale, (R.F. MORFIN, M.A. ALIAPOULIOS, A.H. BENNETT, J.H. HARRISON et P. OFNER, septembre 1970, sous presse, et abstract n°39).

METHODES

Collection et préparation des tissus

Les échantillons d'hyperplasie bénigne de la prostate humaine étaient obtenus au Peter Bent Brigham Hospital, au Massachusetts General Hospital et au Boston City Hospital (Boston) où des opérations chirurgicales de prostatectomie totale ou partielle étaient effectuées.

Le tissu obtenu dès son prélèvement sur le sujet était placé dans un bécher maintenu sur glace pilée. Des morceaux étaient prélevés pour les examens pathologiques et le reste transporté au laboratoire où il était immédiatement traité dans une chambre froide à 4°C.

Le temps nécessaire à ces préparations était généralement d'une heure. Le poids des tissus obtenus variait entre quelques grammes et une centaine de grammes dans les cas extrêmes et était plus généralement d'une vingtaine de grammes.

Les échantillons de prostate de chien provenaient de l'Angell Memorial Hospital (Boston). Les chiens, généralement âgés, étaient sacrifiés par injection d'une dose léthale de Nembutal. La prostate était prélevée dans les deux minutes qui suivaient la mort de l'animal et transportée de la même façon et dans les mêmes temps que les prostates humaines au laboratoire.

.../...

Les prostates obtenues étaient généralement hyperplasiques et bien développées du fait de l'âge des animaux. Leur poids variait entre 15 et 40 grammes.

Les prostates et organes sexuels secondaires de rat ont été obtenus sur des mâles de race Sprague Dawley. Trois rats adultes (400-500g) ont été décapités et les prostates ventrales et dorso-latérales, les glandes prépuciales, l'épididyme et les vésicules séminales prélevées immédiatement. La séparation de ces dernières et des glandes coagulantes était incomplète.

Un "pool" de chacun de ces organes était créé et utilisé dans une seule série d'expériences.

Préparation de broyats et d'homogénats

Les tissus amenés dans la chambre froide étaient coupés très finement avec des ciseaux chirurgicaux jusqu'à l'obtention d'un broyat très homogène.

Ce broyat était utilisé tel quel pour les incubations après pesage de parties aliquotes sur une balance Roller Smith (200 mg de portée). La dispersion du broyat par agitation du tube au début de l'incubation était satisfaisante.

Les broyats étaient généralement utilisés pour la préparation d'homogénats. Après section aux ciseaux. Le tissu était forcé à travers les pores d'un disque au moyen d'une presse à main.

Le broyat obtenu était homogénéisé dans un appareil verre téflon en présence de trois fois son poids en volume de tampon phosphate 0,067 M, pH 7,4. L'homogénat était utilisé directement pour les incubations. Sa quantité était mesurée en gramme-équivalent.

Préparation de fractions sub-cellulaires

L'homogénat utilisé pour ces préparations était obtenu d'une manière identique, mais le tampon phosphate utilisé pour l'homogénisation contenait du saccharose 0,25 M.

L'homogénat était centrifugé à 600 g pendant 10 minutes à 4°C. Un culot de débris cellulaires et de noyaux était éliminé. Le surnageant était à son tour soumis à la centrifugation dans une ultracentrifugeuse Beckman (modèle L) pendant 15 minutes à 9 000 g.

Le culot grisâtre obtenu contenait les mitochondries.

../...

Le surnageant était alors centrifugé pendant 30 minutes à 105000 g. Un culot rose translucide de microsomes était obtenu. Le surnageant était transparent et était utilisé pour les incubations ; néanmoins, soumis pendant encore deux heures à la centrifugation à 105 000 g il laissait déposer une faible quantité de microsomes.

Les culots contenant les microsomes étaient remis en suspension dans le même tampon contenant du saccharose 0,25 M grâce à un homogénéiseur verre-verre à main.

La suspension était recentrifugée à 105 000 g et le culot obtenu remis en suspension de la même manière dans un volume déterminé du même tampon phosphate sans saccharose. Le taux de protéines était alors déterminé sur des parties aliquotes de chaque fraction par la méthode du Biuret. La même détermination était faite dans le surnageant.

Incubations

Les incubations étaient effectuées dans des tubes de 50 ml. Des quantités variables de substrat radioactif étaient mesurées et déposées en solution organique au fond du tube, et le solvant évaporé sous un courant d'azote. On mesurait ensuite 2 ml du milieu d'incubation (tampon phosphate 0,067 M, pH 7,4) qui étaient versés dans le tube.

A cette préparation étaient ajoutés 200 mg du broyat ou 0,2 gramme-équivalent de l'homogénat du tissu. Le volume était complété à 5 ml par addition de tampon ou d'une solution de cofacteurs dans ce tampon.

Du NADPH, du NADH ou du NAD+ & NADP+ étaient utilisés comme cofacteurs en quantités de 1 mg par incubation. Ils étaient solubilisés et pipetés dans le tube juste avant les tissus qui étaient toujours introduits en dernier.

Les incubations se faisaient à 37°C dans un appareil de Warburg avec agitation et en présence d'air. Les temps d'incubation étaient variables.

Après incubation un contrôle de la contamination bactérienne était fait dans les tubes (5), et les réactions enzymatiques arrêtées par addition de 6 ml d'acétate d'éthyle, agitation vigoureuse et congélation à - 18°C.

.../...

Extraction et séparation des radiométabolites

Les stéroïdes radioactifs étaient extraits des milieux d'incubation aqueux liquéfiés, au moyen de partitions répétées avec de l'acétate d'éthyle. Le volume de l'extrait obtenu était réduit sous un courant d'azote et la radioactivité déterminée par mesure sur une partie aliquote.

Les radiométabolites étaient d'abord séparés sur CCM de silice G dans le système n°8. La (5α) dihydrotestostérone, l'androstérone et l'*épi*androstérone, isopolaires dans ce système étaient séparées par CCM sur alumine G dans le système n°7.

La première CCM ne séparait pas non plus les deux dihydroxy (5α) androstanes épimères ; leur mélange était résolu par CCM sur alumine G dans le système n°5. La quantitation des radiométabolites était effectuée comme décrit dans les méthodes communes pour ces travaux.

Identification des radiométabolites

D'après les propriétés chromatographiques de chaque radiométabolite et leurs comparaisons avec celles de stéroïdes radioactifs standards, une assertion sur l'identité de chacun d'entre eux était faite.

L'identité de certains radiométabolites présents en quantité suffisante était prouvée par cristallisation à activité spécifique constante après dilution isotopique.

RESULTATS

HYPERTROPHIE BENIGNE DE LA PROSTATE HUMAINE

INCUBATION D'HOMOGENATS AVEC DE LA TESTOSTERONE-4-^{14}C

Identité et taux des radiométabolites

L'identité de la (5α) dihydrotestostérone, du dihydroxy-3α,17β (5α) androstane et du dihydroxy-3β,17β (5α) androstane a été prouvée par cristallisation à activité spécifique constante (figure 10).

Ces radiométabolites provenaient d'incubations de testostérone en présence de NADPH.

La (5α) androstanedione et l'androstènedione ont été reconnues dans ces mêmes incubations par comparaison de leurs mobilités dans deux systèmes chromatographiques avec celles de composés authentiques radioactifs.

.../...

Des métabolites polaires n'ont pas été identifiés.

La figure 11 représente les taux des principaux métabolites obtenus après incubation de 2 430 pmoles de testostérone-4-^{14}C (0,48 µM) avec 0,2 gramme-équivalent d'homogénats en présence de NADPH.

Les résultats de 9 prostates sont analysés et montrent la quantité dominante de métabolites réduits en 5α et 17β-hydroxylés dans tous les cas.

Les métabolites polaires non identifiés sont signalés de façon à pouvoir établir la totalité des métabolites obtenus. Ces composés polaires ont été extraits des incubations par de l'acétate d'éthyle. Ceci suggère la présence de stéroïdes en $C_{19}O_3$.

Les contributions relatives des métabolites aux voies métaboliques des composés 17β-hydroxylés (voie réductive) et des composés 17-cétoniques (voie oxydative) sont exposées dans le tableau 11 pour sept prostates.

Les temps d'incubation étaient de 30 minutes. Ces contributions ont été déterminées par la somme des métabolites 17β-hydroxylés et la somme des métabolites 17-cétoniques.

L'influence des cofacteurs sur les métabolismes est nette ; sauf dans un cas (prostate 16) la voie réductive prédomine quelle que soit la supplémentation en cofacteurs.

La prostate n°13 présentant une activité oxydative en présence de NADPH provenait d'un sujet traité pendant 7 jours par le chloro,tri (p.méthoxy-phényl) éthylène (TACE, 24 mg/jour) pour permettre la cystoscopie une semaine avant l'ablation de la glande.

Des résultats plus détaillés basés sur deux prostates sont exposés dans le tableau 12. Pour ces résultats les temps d'incubation étaient de 15 minutes.

Les taux de métabolisme les plus importants, notamment en ce qui concerne la 5α-réduction, ont été obtenus en présence de NADPH. Moins de métabolites étaient formés en l'absence de cofacteurs exogènes.

Ceci impliquait une dilution ou une détérioration des cofacteurs propres au tissu dans le milieu d'homogénisation ou d'incubation.

Le taux élevé de l'androstènedione formée en présence de NAD+ et non en présence de NADP+ exprime, comme chez le chien, une spécificité de la 17β-oxydoréductase pour ce premier cofacteur.

Au prime abord, pour permettre l'expression des enzymes et l'identification des métabolites de la testostérone, des temps d'incubations suffisamment longs (30 minutes) ont été utilisés.

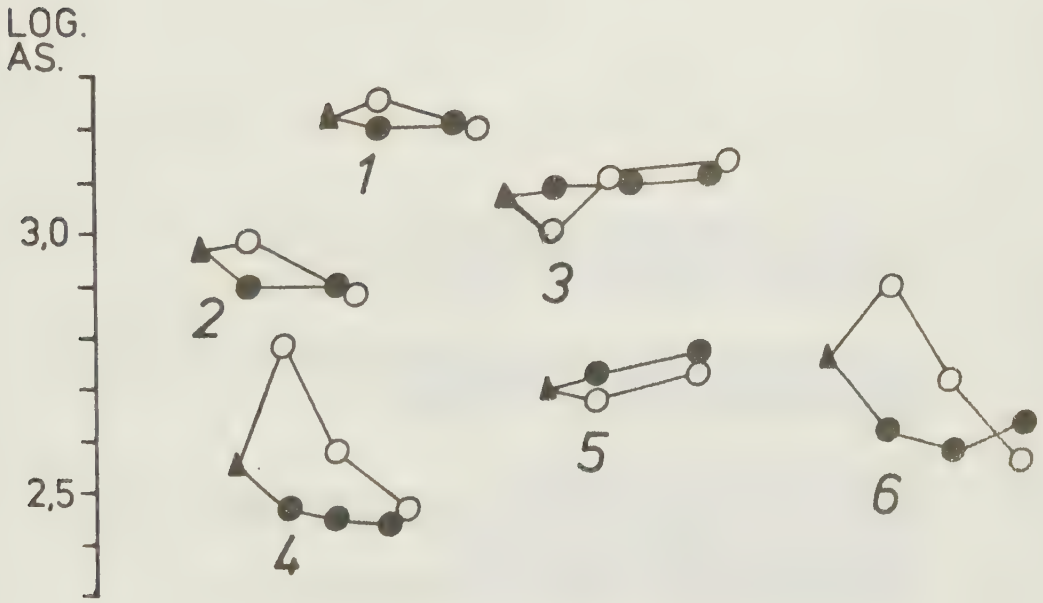
.../...

Figure 10 : Cristallisations à activité spécifique constante .

▲ Stéroïdes aprés dilution isotopique

● Cristaux

○ Eaux-mères



1 - Dihydroxy-3α,17β (5α) androstane, provenant de testostérone/ homogénat de prostate humaine hyperplasique ;
2 - (5α) dihydrotestostérone, provenant de testostérone/homogénat de cancer de prostate humaine taité aux estrogènes ;
3 - (5α) dihydrotestostérone, provenant de testostérone/microsomes de prostate humaine hyperplasique ;
4 - dihydroxy-3β,17β(5α) androstane, provenant de testostérone/ homogénat de prostate humaine hyperplasique ;
5 - Dihydroxy-3α,17β (5α) androstane, provenant de (5α) dihydro-testostérone/homogénat de prostate humaine hyperplasique ;
6 - Dihydroxy-3β,17β (5α) androstane, provenant de (5α) dihydro-testostérone/homogénat de prostate humaine hyperplasique

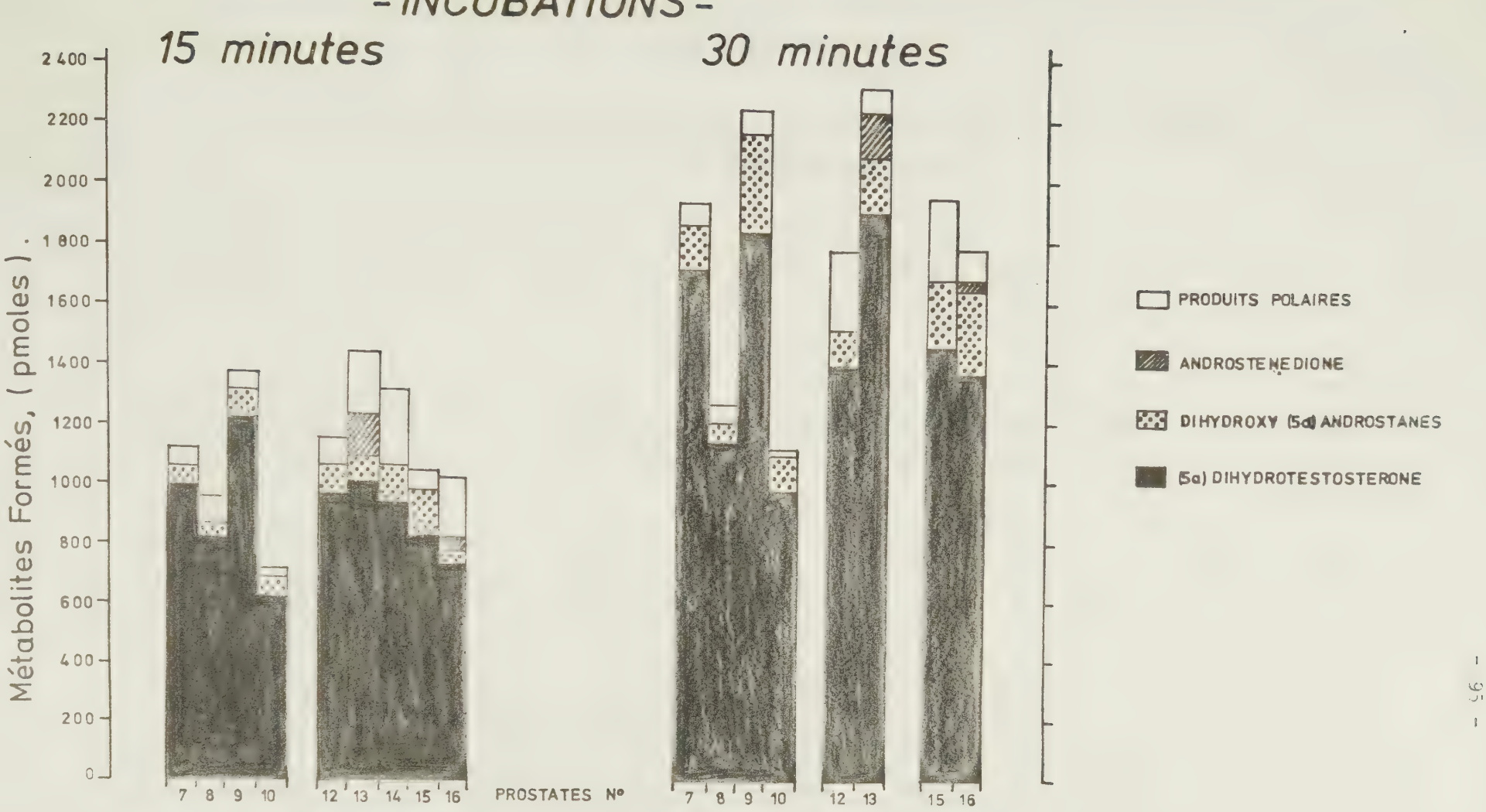


Figure 11 : Métabolites de la testostérone-4-^{14}C (2430 pmoles, 0,48 µM) obtenus par incubations d'homogénats (0,2 g) de prostate humaine, en présence de NADPH .

TABLEAU 11

METABOLISME DE LA TESTOSTERONE-4-^{14}C PAR DES HOMOGENATS DE SEPT SPECIMENS DE PROSTATE HYPERPLASIQUE HUMAINE

METABOLITES	COFACTEURS	N° 7	N° 8	N°10	N°12	N°13	N°15	N°16
STEROIDES HYDROXYLES EN 17β	SANS	480	280	330	215	710	50	35
(dihydrotestostérone	NADPH	1885	1210	1100	1530	2110	1690	1670
+ androstanediols)	NAD+ & NADP+	-	850	700	1370	-	1470	525
STEROIDES 17-CETONIQUES	SANS	23	0	0	0	150	0	0
(androstènedione	NADPH	0	0	0	0	140	0	18
+ androstanedione)	NAD+ & NADP+	-	150	80	100	-	80	860

Les résultats présentés sont exprimés en pmoles .

Incubations = 2400 pmoles (0,48 µM) / 30 minutes / 0,2 g équivalents d'homogénat .

Androstanediols = Dihydroxy-3α,17β et dihydroxy-3β,17β (5α) androstanes .

TABLEAU 12

METABOLITES DE LA TESTOSTERONE FORMES PAR DES HOMOGENATS OU DES BROYATS DE PROSTATE EN PRESENCE OU EN L'ABSENCE DE DIFFERENTS COFACTEURS

PROSTATES		HUMAINES		CANINES	
STEROIDES	COFACTEUR	BROYAT	HOMOGENAT	BROYAT	HOMOGENAT
5α-DHT	SANS	45	45	-	70
	NADPH	160	940	110	205
	NAD+	80	100	-	-
	NADP+	-	290	-	-
3α,17β-DIOL	SANS	0	0	-	0
	NADPH	20	125	-	50
	NAD+	0	35	-	-
	NADP+	-	50	-	-
3β,17β-DIOL	SANS	0	0	-	0
	NADPH	5	40	-	20
	NAD+	0	5	-	-
	NADP+	-	10	-	-
5α-A.DIONE	SANS	5	5	-	30
	NADPH	15	30	-	30
	NAD+	20	30	-	-
	NADP+	-	15	-	-
A^4-DIONE	SANS	20	50	-	0
	NADPH	80	20	-	0
	NAD+	130	390	-	-
	NADP+	-	30	-	-
METABOLITES POLAIRES	SANS	65	30	-	165
	NADPH	55	105	-	145
	NAD+	10	160	-	-
	NADP+	-	180	-	-

Les résultats présentés sont exprimés en pmoles et proviennent de l'incubation pendant 30 minutes à 37°C de 200 mg de la préparation du tissu avec 2430 pmoles de testostérone-4-^{14}C, 0,48 µ M.

5α-DHT = *(5α) dihydrotestostérone ;* 3α,17β-DIOL = *Dihydroxy-3α,17β (5α) androstane ;* 3β,17β-DIOL = *Dihydroxy-3β,17β (5α) androstane ;* 5α-A.DIONE = *(5α) androstanedione ;* A^4-DIONE = *Androstènedione .*

Par la suite, l'identité des métabolites prouvée, des temps plus courts ont été utilisés (2 à 15 minutes) de façon à établir les vitesses initiales des réactions enzymatiques sur une portion de courbe linéaire.

Transformation de la testostérone à différents temps d'incubation

La testostérone-4-^{14}C utilisée comme substrat (2 430 pmoles, 0,48 µM) était incubée avec 0,2 gramme-équivalent d'homogénats en présence ou en l'absence de NADPH.

Les temps d'incubation variaient entre 2 et 30 minutes. L'analyse par CCM des extraits révélait la testostérone et les radiométabolites formés.

Les quantités de radiométabolites formées à différents temps d'incubation dans des conditions d'incubation identiques pour cinq prostates différentes sont exposées dans la figure 12.

Les mesures des quantités de (5α) dihydrotestostérone, de dihydroxy-3α,17β (5α) androstane et de dihydroxy-3β,17β (5α) androstane ont été faites pour ces mêmes prostates (figure 12). Les incubations des homogénats de prostates en présence de NADPH forment les métabolites de la testostérone selon un axe commun qui pourrait être tracé entre 2 et 30 minutes.

La forme linéaire des tracés montre que la quantité de substrat seule était limitante à l'expression des activités enzymatiques et que les produits formés n'exerçaient pas d'effet visible sur le taux des transformations.

La prostate C provenait d'un sujet atteint d'un adénocarcinome de la prostate qui avait été traité au 17α-éthynylestradiol (50µg/jour pendant 3 semaines) avant la prostatectomie.

Pour tous ces tissus, les stéroïdes 17β-hydroxylés ((5α) dihydrotestostérone + dihydroxy (5α) androstanes) composent la majorité des métabolites même pour la prostate C.

Les incubations des homogénats de prostate sans cofacteurs exogènes ont rendu des résultats plus dispersés.

Les courbes tracées sur la figure 12 montrent les taux de transformation très bas dus au manque de cofacteurs.

Le cas de la prostate 13 a été surprenant ; les incubations ont présenté des taux importants d'androstènedione dont l'apparition et l'oscillation avec la testostérone n'ont pu être expliquées d'une façon satisfaisante

.../...

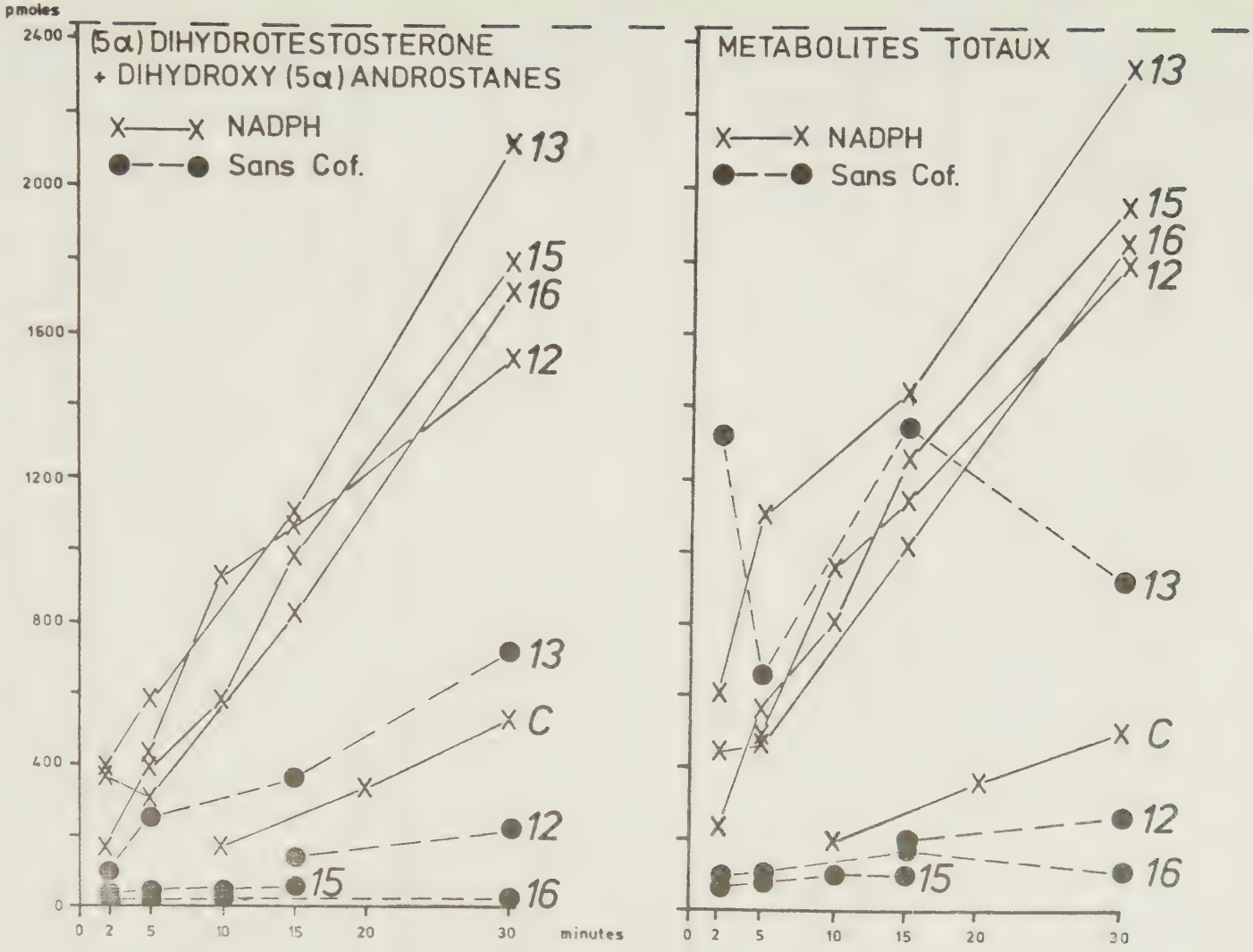


Figure 12 : Métabolisme de la testostérone (0,48 µM) par des homogénats de prostates humaines (0,2 g).

La prostate 13 provenait d'un individu traité au Chloro,tri (p. méthoxy-phényl) éthylène (TACE,24 mg par jour) pendant une semaine et opéré 7 jours après l'arrêt de ce traitement.

Dans ces cas d'incubations sans cofacteurs exogènes, les stéroïdes 17β-hydroxylés ((5α) dihydrotestostérone + dihydroxy (5α) androstanes) prédominent également.

Les tissus incubés pendant 15 minutes avec de la testostérone métabolisaient moins de 50 % du substrat. Les taux de métabolites étaient cependant suffisants pour permettre une séparation et une mesure précise de ceux-ci.

Ce sont donc les résultats obtenus après 15 minutes d'incubation qui ont été utilisés pour la détermination des vitesses de réaction enzymatique.

Activités enzymatiques

Les vitesses de réactions enzymatiques ont été exprimées pour la 5α réductase,et les 17β,3α et 3β oxydoréductases en picomoles de substrat utilisées par minute.

Du fait des différentes étapes des voies de métabolisme de la testostérone, deux substrats différents ont été utilisés dans des conditions identiques : la testostérone-4-^{14}C et la (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C.

La somme des métabolites réduits en 5α a permis de mesurer la réduction en 5α de la testostérone, et la somme des métabolites 17-cétoniques l'oxydation en 17 de cette hormone.

La mesure du dihydroxy-3α,17β (5α) androstane et celle du dihydroxy-3β,17β (5α) androstane ont permis de mesurer respectivement la réduction en 3α et en 3β de la (5α) dihydrotestostérone formée à partir de la testostérone et présente à ce moment (15 minutes) dans le milieu-d'incubation.

Ces mesures des activités 3α et 3β réductasiques ne pouvaient être absolues du fait de la réduction en 5α nécessaire au préalable.

L'incubation de (5α) dihydrotestostérone dans des conditions identiques à celles de la testostérone a permis d'établir plus précisément ces activités et de les comparer.

Il restait également à savoir si les comparaisons que l'on voulait effectuer étaient possibles.

.../...

Pour cela les mesures devaient se situer sur une partie linéaire de la courbe admettant la concentration du substrat en abcisse et la vitesse de réaction en ordonnée.

Des incubations similaires d'homogénats de prostate ont été effectuées en présence de NADPH avec une concentration double de testostérone-4-^{14}C (4 860 pmoles, 0,96 µM) pendant 15 minutes.

Les résultats obtenus devaient être doubles de ceux obtenus avec une concentration de 0,48 µM pour être proportionnels et comparables.

Le tableau 13 présente les résultats obtenus après incubation de deux concentrations différentes de testostérone-4-^{14}C avec 0,2 g équivalents d'homogénats de la même prostate humaine.

Les moyennes de duplicata d'expériences ont été utilisées. Seule la réduction en 5α présente une vitesse double après incubation d'une quantité double de substrat.

Cette première étape enzymatique dans le métabolisme de la testostérone peut donc être mesurée. Cette réduction en 5α est prédominante et semble être compétitive de l'oxydation en 17 qui ne peut donc s'exprimer linéairement.

Les réductions en 3α et 3β sont fonction de la (5α) dihydrotestostérone présente et pouvant être métabolisée. L'activité 3α réductasique est plus importante que celle de la 3β réductase dans la prostate humaine *in vitro*.

Le tableau 14 présente les résultats obtenus après l'incubation de (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C (0,48 µM) avec 0,2 g équivalents d'homogénats pendant 15 minutes.

Ces homogénats provenaient des mêmes prostates utilisées pour les incubations de testostérone-4-^{14}C.

L'oxydation en 17 de la (5α) dihydrotestostérone s'exprime d'une façon identique à celle de la testostérone (tableau 13).

La concentration suffisante de (5α) dihydrotestostérone permet aux 3α et 3β oxydoréductases de s'exprimer plus intensément.

La possibilité d'une inhibition de ces enzymes par la testostérone peut être écartée ; en effet les vitesses de réduction en 3α et 3β sont plus importantes avec la (5α) dihydrotestostérone qu'avec la testostérone comme substrat, et leur augmentation est proportionnelle à la

.../...

TABLEAU 13

ENZYMES METABOLISANT LA TESTOSTERONE DANS LES BROYATS ET LES HOMOGENATS DE PROSTATE HUMAINE ET CANINE

REACTION ENZYMATIQUE	5α REDUCTION		17β OXYDOREDUCTION		3α OXYDOREDUCTION		3β OXYDOREDUCTION	
CONCENTRATION DU SUBSTRAT (μM)	0,48	0,96	0,48	0,96	0,48	0,96	0,48	0,96
HOMOGENATS DE PROSTATE HUMAINE	66,6	120,0	1,5	2,4	7,6	10,3	2,5	2,9
HOMOGENATS DE PROSTATE CANINE	18,6	33,3	2,1	3,6	3,2	5,5	1,5	2,3
BROYATS DE PROSTATE HUMAINE	13,3	25,4	6,1	4,1	1,3	2,6	0,3	1,1
BROYATS DE PROSTATE CANINE	4; 1	-	1,1	-	0,4	-	1,0	-

Les résultats sont exprimés en picomoles / minute . Ces vélocités ont été obtenues à partir d'incubations de testostérone à 2 concentrations différentes en présence de NADPH pendant 15 minutes . Les résultats pour les broyats de prostate canine ont été calculés à partir d'incubations dans des conditions différentes (voir chapitre II) .
5α REDUCTION = *(5α)dihydrotestostérone + (5α)androstanedione + Dihydroxy-3α,17β & Dihydroxy-3β,17β(5α)androstanes.*
17β OXIDOREDUCTION = *Δ^4-androstènedione + (5α)androstanedione.*
3α OXIDOREDUCTION = *Dihydroxy-3α,17β (5α)androstane.* 3β OXIDOREDUCTION = *Dihydroxy-3β,17β (5α)androstane .*

TABLEAU 14

ENZYMES METABOLISANT LA (5α) DIHYDROTESTOSTERONE DANS LES BROYATS ET LES HOMOGENATS DE PROSTATE HUMAINE ET CANINE

REACTION ENZYMATIQUE	17β OXYDOREDUCTION	3α OXYDOREDUCTION	3β OXYDOREDUCTION
HOMOGENATS DE PROSTATE HUMAINE	1,4	19,5	5,1
HOMOGENATS DE PROSTATE CANINE	0	34,8	11,2
BROYATS DE PROSTATE HUMAINE	2,8	4,9	1,4
BROYATS DE PROSTATE CANINE	0,8	1,4	1,8

Les résultats sont exprimés en picomoles par minute . Ces valeurs ont été obtenues à partir d'incubations en présence de NADPH avec de la (5α)dihydrotestostérone-4-^{14}C (0,48 µM) pendant 15 minutes . Les résutats sur broyats de prostate canine ont été calculés à partir d'incubations dans des conditions différentes (voir Chapitre II) .
17β OXIDOREDUCTION = *(5α) androstanedione.* 3α OXIDOREDUCTION = *Dihydroxy-3α,17β (5α) androstane* . 3β OXIDOREDUCTION = *Dihydroxy-3β,17β(5α) androstane* .

concentration de (5α) dihydrotestostérone mise en présence de ces enzymes.

INCUBATION D'HOMOGENATS AVEC DE LA (5α) DIHYDROTESTOSTERONE-4-^{14}C

Identité et taux des radiométabolites

L'identité du dihydroxy-3α,17β (5α) androstane et du dihydroxy-3β 17β (5α) androstane a été prouvée par cristallisation à activité spécifique constante (figure 10).

Ces radiométabolites provenaient d'incubations de la (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C (0,48 µM) en présence de NADPH.

Dans ces mêmes incubations la (5α) androstanedione en quantités moins importantes a été identifiée par comparaison de sa mobilité dans deux systèmes chromatographiques avec celle du composé authentique radioactif.

Des métabolites polaires n'ont pas été identifiés.

La présence d'un cofacteur était nécessaire à une expression mesurable des enzymes.

En présence de NADPH et dans trois cas (prostates n°15,16 et 17), respectivement 18, 31 et 22 % du substrat étaient transformés dans ces mêmes conditions.

Ces taux de transformation étaient nettement inférieurs à ceux de la testostérone. Les diols épimériques correspondaient à la majorité des métabolites de la (5α) dihydrotestostérone.

Transformation de la (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C à différents temps d'incubation

La (5α) dihydrotestostérone utilisée comme substrat (2 415 pmoles, 0,48 µM) était incubée avec 0,2 g. équivalents d'homogénats, en présence de NADH ou de NADPH.

Les temps d'incubation variaient de 5 à 30 minutes. L'analyse par CCM des extraits révélait la (5α) dihydrotestostérone et les métabolites formés.

Les quantités de radiométabolites mis en évidence à différents temps d'incubation dans des conditions d'incubation identiques pour trois prostates différentes sont exposées dans la figure 13.

L'addition de cofacteurs était nécessaire pour l'obtention d'une quantité mesurable de radiométabolites.

.../...

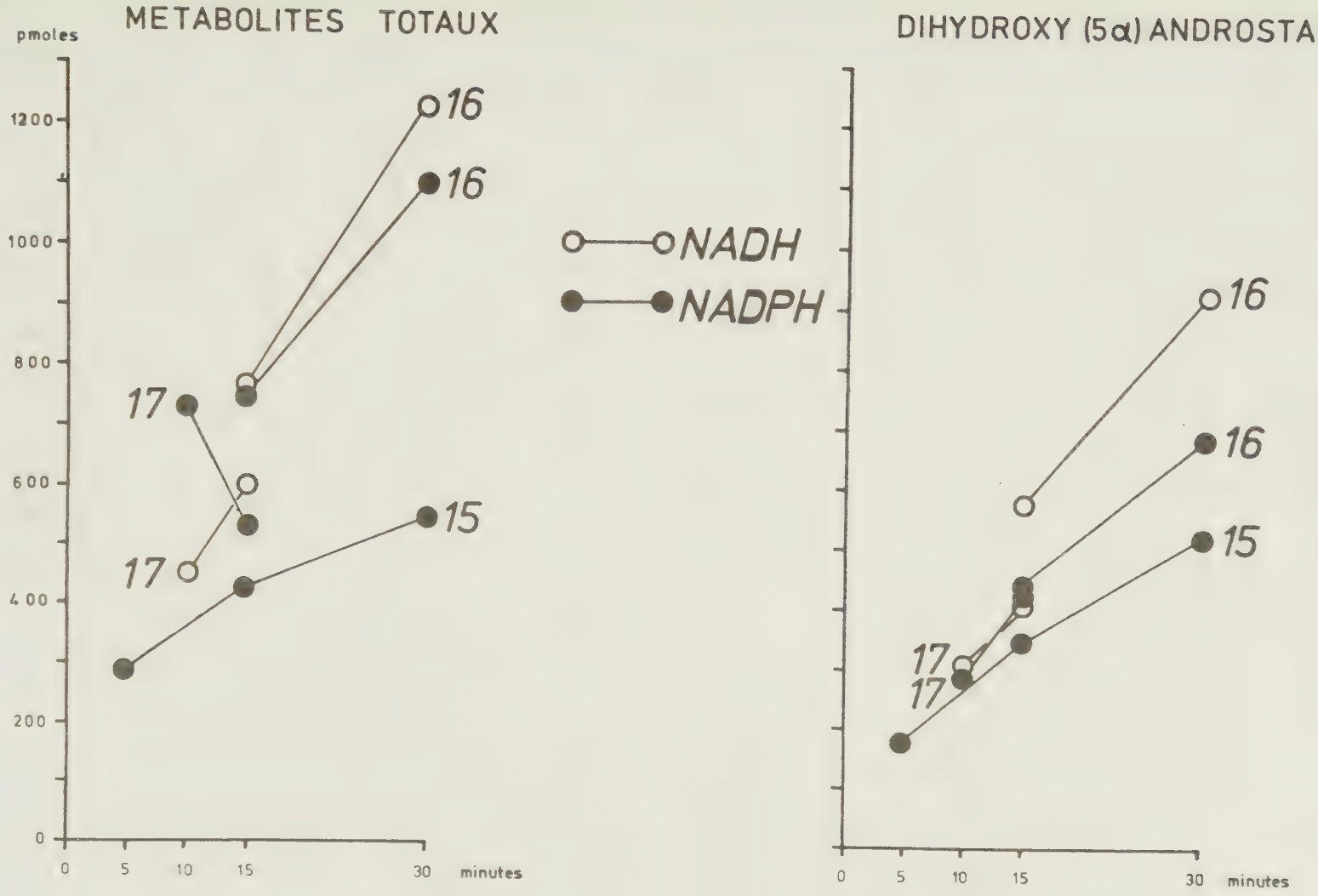


Figure 13 : Métabolisme de la (5α)DIHYDROTESTOSTERONE (0,48 µM) par des homogénats (0,2 g) de prostate humaine.

La mesure des (5α) androstanediols totaux est exposée pour ces mêmes prostates dans la figure 13.

On remarque que dans ces prostates , une addition de NADH peut remplacer celle de NADPH dans l'expression des métabolismes totaux.

La courbe descendante obtenue pour la prostate n°17 était le fait d'une quantité anormale de produits polaires apparaissant seulement après 10 minutes d'incubation. On a suspecté un artéfact de migration sur la plaque.

Ces cinétiques comparées à celles obtenues avec les incubations de testostérone (figure 12) ont montré que la (5α) dihydrotestostérone est transformée moins rapidement que la testostérone dans des conditions identiques.

L'apparition des diols est cependant plus rapide du fait de la concentration plus élevée de (5α) dihydrotestostérone disponible dans les incubations.

Les résultats obtenus après 15 minutes d'incubation ont été utilisés pour la détermination des vitesses de réactions enzymatiques.

Activités enzymatiques

Les vitesses de réactions enzymatiques ont été exprimées pour la 17β, la 3β et la 3α oxydoréductase en picomoles de substrat transformées par minute.

Ces vélocités étaient obtenues à partir d'incubations de 15 minutes, en présence de NADPH. Avec ce cofacteur, les conditions n'étaient pas optimales à l'expression de la 17β oxydoréductase dont la mesure est comparable à celle obtenue avec la testostérone (tableaux 13 et 14).

Par contre, les vitesses de réduction en 3α et 3β sont environ deux fois plus importantes que celles obtenues avec la testostérone.

L'incubation d'homogénats de prostate humaine à une seule concentration n'a pas permis d'effectuer des comparaisons valables entre les activités des différentes enzymes décrites ni entre les activités de tissus différents.

Les mêmes prostates ayant été cependant utilisées pour les incubations de testostérone et de (5α) dihydrotestostérone dans des conditions identiques, la comparaison des résultats obtenus avec ces deux substrats est possible (tableaux 13 et 14).

.../...

INCUBATIONS DE BROYATS DE PROSTATE AVEC DE LA TESTOSTERONE-4-^{14}C ET DE LA (5α) DIHYDROTESTOSTERONE-4-^{14}C

Identité et taux des radiométabolites

Les radiométabolites obtenus après incubation de broyats de prostate humaine n'ont pas été identifiés par cristallisation à activité spécifique constante.

Leur identité était basée sur la comparaison de leurs mobilités dans deux systèmes chromatographiques avec celles de composés authentiques radioactifs.

Essentiellement, ces radiométabolites possédaient des propriétés identiques à celles de ceux identifiés dans les incubations d'homogénats.

Les résultats d'incubations de 15 minutes en présence de différents cofacteurs sont exposés dans le tableau 12. Les nombres de picomoles de testostérone transformée par les broyats de prostate humaine sont bien moins importants que ceux obtenus avec les homogénats.

Les expressions des activités enzymatiques ne sont donc pas optimales mais plus proches de la situation *in vivo* car les structures cellulaires sont conservées dans les broyats.

Les métabolismes obtenus sans addition de cofacteurs exogènes étaient cependant identiques, sinon plus importants qu'avec les homogénats. Le taux élevé de l'androstènedione formée en présence de NAD+ et non en présence de NADP+ exprime, comme pour les homogénats, une spécificité de la 17β oxydoréductase pour ce premier cofacteur.

Les incubations de (5α) dihydrotestostérone ont donné, à l'analyse des extraits par CCM, des métabolites identiques à ceux produits par les homogénats. Leur quantité était cependant moins importante.

Activités enzymatiques

Les conditions d'incubation des broyats de prostate étaient exactement similaires à celles utilisées pour les homogénats.

Le calcul des vitesses de réactions enzymatiques en picomoles de substrat transformé par minute était effectué sur les valeurs obtenues avec des incubations de 15 minutes.

.../...

Les contributions relatives de chaque enzyme au métabolisme de la testostérone et de la (5α) dihydrotestostérone sont exposées dans les tableaux 13 et 14.

La vitesse de réduction en 5α de la testostérone est plus importante que celles des autres transformations enzymatiques ; elle correspond cependant à 1/5 de celle observée pour les homogénats des mêmes tissus.

La (5α) dihydrotestostérone formée étant en quantité plus faible que dans les incubations d'homogénats, il est normal que les vitesses de formation des (5α) androstanediols soit inférieures à celles trouvées pour les homogénats.

Pour l'oxydation en 17, on remarque que les résultats obtenus ne sont pas proportionnels du fait du manque de cofacteur oxydé (tableau 13).

La réduction en 3α est plus importante que celle en 3β; les mesures sont peu importantes du fait de la petite quantité de (5α) dihydrotestostérone formée par les broyats de prostate.

L'incubation de (5α) dihydrotestostérone a permis de mieux étudier les 3α et 3β oxydoréductases (tableau 14). Dans ce cas aussi, la réduction en 3α est plus importante que celle en 3β.

Ces activités enzymatiques sont environ quatre fois inférieures à celles mesurées dans les incubations d'homogénats.

Ces résultats tendent à prouver que les enzymes métabolisant les stéroïdes dans la prostate ont une localisation intracellulaire.

PROSTATES CANINES

INCUBATION D'HOMOGENATS AVEC DE LA TESTOSTERONE-4-^{14}C ET DE LA (5α) DIHYDROTESTOSTERONE-4-^{14}C

Identité et taux des radiométabolites

Les radiométabolites obtenus après incubation de testostérone et de (5α) dihydrotestostérone radioactive n'ont pas été identifiés par cristallisation à activité spécifique constante.

Leur identification était basée sur la comparaison de leurs propriétés chromatographiques avec celles de composés authentiques radioactifs.

.../...

L'identification des métabolites radioactifs de la testostérone par analyse de leur radiohomogénéité a été faite sur la prostate canine après les expériences *in vivo* et *in vitro* (chapitres I et II).

Les métabolites polaires obtenus dans tous les cas n'ont pas été identifiés.

Le tableau 12 présente les résultats obtenus après incubation de testostérone avec 0,2 grammes équivalents d'homogénats de prostate canine pendant 15 minutes en présence ou en l'absence de NADPH.

La réduction en 5α de la testostérone prédomine dans tous les cas. L'oxydation en 17, identique en présence ou en l'absence de NADPH, montre que cette oxydation se fait grâce à un cofacteur présent dans le tissu.

Par contre le NADPH est nécessaire à l'expression de la réduction en 5α ,3α et 3β .

L'incubation de (5α) dihydrotestostérone donnait naissance aux deux (5α) androstanediols épimères, mais on n'observait pas de trace de (5α) androstanedione.

L'incubation de testostérone à deux concentrations différentes a permis d'établir des cinétiques et de comparer le métabolisme de cette hormone dans les tissus canins et humains.

Activités enzymatiques

Les contributions relatives de chaque enzyme au métabolisme de la testostérone et de la (5α) dihydrotestostérone sont exposées dans les tableaux 13 et 14.

Le calcul des vitesses de réactions enzymatiques en picomoles de substrat transformé par minute a été effectué sur les valeurs obtenues avec des incubations de 15 minutes.

La testostérone (tableau 13) est réduite en 5α. Les vitesses de cette réduction sont plus importantes que les autres transformations subies par la molécule de substrat.

L'activité 5α réductasique contenue dans les homogénats de prostate canine est inférieure à celle contenue dans les homogénats de prostate humaine ; elle se rapproche plutôt de l'activité présentée par les broyats de prostate humaine.

.../...

L'oxydation en 17 de la testostérone n'est pas optimale, les incubations ayant été effectuées en présence de NADPH et non de NAD+.

La réduction en 3α et en 3β de la (5α) dihydrotestostérone formée à partir de la testostérone peut être observée.

On a été surpris de constater que l'activité de la 3α oxydoréductase est supérieure à celle de la 3β oxydoréductase. On se souvient en effet que lors des expériences *in vivo* et *in vitro* décrites (chapitres I et II) l'inverse avait été observé.

La possibilité d'une inhibition de la 3β oxydoréductase par la testostérone présente dans le milieu d'incubation, et la possibilité d'une dénaturation de cette enzyme au cours de l'homogénisation ont été considérées.

L'incubation de (5α) dihydrotestostérone avec des homogénats de prostate canine (tableau 14) a permis d'éliminer cette première hypothèse.

En effet, dans ces conditions trois fois plus de dihydroxy-3α, 17β (5α) androstane que d'épimère en 3β étaient formés. Ceci permet de penser que la 3β oxydoréductase est partiellement dénaturée lors du processus d'homogénisation.

INCUBATION DE BROYATS DE PROSTATE CANINE AVEC DE LA TESTOSTERONE-4-^{14}C ET DE LA (5α) DIHYDROTESTOSTERONE-4-^{14}C

Identité et taux des radiométabolites

Les incubations de broyats de prostate canine n'ont pas été effectuées dans des conditions identiques à celles présentées dans ce chapitre. Les conditions utilisées sont celles décrites dans le chapitre II.

Les incubations étaient effectuées pendant 60 minutes. La concentration de substrat était 0,48 µM mais le rapport tissu/substrat était le double de celui utilisé pour les incubations décrites dans ce chapitre.

Si l'on assumait la linéarité des résultats lorsque le temps d'incubation varie et lorsque le rapport tissu/sustrat varie, il faudrait diviser les taux de transformation par un facteur de 8 pour obtenir une équivalence aux résultats obtenus avec les homogénats de prostates humaines et canines.

.../...

Cette opération a été effectuée pour la (5α) dihydrotestostérone formée seule (tableau 12) pour fournir une comparaison avec les homogénats de prostate canine.

Activités enzymatiques

Les résultats présentés dans les tableaux 13 et 14 ont été calculés à partir des résultats du chapitre II. Ils permettent seulement de montrer que les broyats de prostate canine sont peu actifs et que la réduction en 3β s'exprime mieux que la réduction en 3α, contrairement aux homogénats de prostates humaines et canines, et conformément aux résultats sur la prostate canine *in vivo* présentés dans les chapitre I et II.

REDUCTION EN 3α ET EN 3β DANS LES TISSUS SEXUELS SECONDAIRES DE TROIS ESPECES

Les réductions en 3α et 3β de la testostérone et de la (5α) dihydrotestostérone ont été mises en évidence respectivement par la formation de dihydroxy-3α,17β (5α) androstane et de dihydroxy-3β,17β (5α) androstane.

Le calcul du rapport de ces deux diols (épimère 3α/épimère 3β) permettait d'exprimer leurs quantités relatives dans les extraits des incubations.

Les rapports permettaient également de mettre en évidence laquelle des deux réductions était prédominante dans le tissu et de comparer sur ce point différents tissus et différentes préparations.

Les rapports obtenus lors des incubations d'homogénats et de broyats de prostate sont présentés pour l'homme et pour le chien dans le tableau 15. De plus, les résultats obtenus avec des incubations de broyats et d'homogénats d'organes sexuels secondaires du rat sont présentés dans ce même tableau.

On remarque que le substrat utilisé (testostérone ou (5α) dihydrotestostérone) n'influe pas significativement sur la valeur des rapports.

Les tissus humains comme ceux du rat présentent une réduction en 3α plus importante qu'en 3β . Le contraire peut être observé dans le cas des broyats de prostate canine, mais non pour les homogénats. Ce changement peut être du à une dénaturation partielle de la 3β oxydoréductase au cours de l'homogénisation pour la prostate du chien.

.../...

TABLEAU 15

EXPRESSION DU RAPPORT

$$\frac{\text{DIHYDROXY-3}\alpha,17\beta\ (5\alpha)\ \text{ANDROSTANE}}{\text{DIHYDROXY-3}\beta,17\beta\ (5\alpha)\ \text{ANDROSTANE}}$$

PREPARATION INCUBEE	TESTOSTERONE	(5α)DIHYDROTESTOSTERONE
HOMOGENAT D'HBPH N°12	2,27	2,62
BROYAT D'HBPH N°13	2,39	-
HOMOGENAT D'HBPH N°13	-	2,33
BROYAT D'HBPH N°14	3,38	3,56
HOMOGENAT D'HBPH N°14	3,53	3,20
HOMOGENAT D'HBPH N°15	3,38	3,31
BROYAT DE PROSTATE CANINE	0,67	0,78
HOMOGENAT DE PROSTATE CANINE	3,35	3,11
BROYAT DE PROSTATE VENTRALE DE RAT	11,20	13,00
HOMOGENAT DE PROSTATE VENTRALE DE RAT	10,80	9,12
BROYAT DE PROSTATE DORSALE DE RAT	2,21	2,30
BROYAT DE VESICULES SEMINALES DE RAT	2,97	2,23
BROYAT DE GLANDES PREPUCIALES DE RAT	1,73	1,87
BROYAT D'EPIDIDYME DE RAT	6,41	5,55

2430 pmoles de substrat étaient incubées pendant 30 minutes en présence de NADPH et de 0,2 gramme équivalent de la préparation .
HBPH = *Hypertrophie Bénigne de Prostate Humaine .*

Cette dénaturation ne se manifeste ni pour la 3α oxydoréductase ni pour la 3β oxydoréductase dans les tissus humains ou du rat pour lesquels aucune différence n'a pu être observée entre les incubations de broyats et celles d'homogénats.

La prostate ventrale et l'épididyme du rat étaient les tissus présentant relativement le plus de 3α réduction de la testostérone ou de la (5α) dihydrotestostérone ; les autres tissus sexuels secondaires du rats et les prostates humaines et canines présentaient une dominance moins marquée de l'épimère en 3α.

ACTIVITE ENZYMATIQUE DE FRACTIONS SUB-CELLULAIRES DE TISSU PROSTATIQUE HUMAIN

Microsomes

La préparation de microsomes obtenue après 30 minutes de centrifugation à 105 000 g a été utilisée fraîche ou après congélation.

Les fractions fraîches ont été incubées sans saccharose ; les fractions congelées en présence de saccharose 0,25 M.

Une quantité de microsomes frais correspondant à 4 mg de protéines a été incubée avec de la testostérone-4-^{14}C (243 pmoles, 0,048 µM) pendant 2 heures.

En présence de NADPH, 86 % du substrat étaient transformés en (5α) dihydrotestostérone. Aucune transformation n'était observée en l'absence de cofacteurs ou en présence de cofacteurs oxydés.

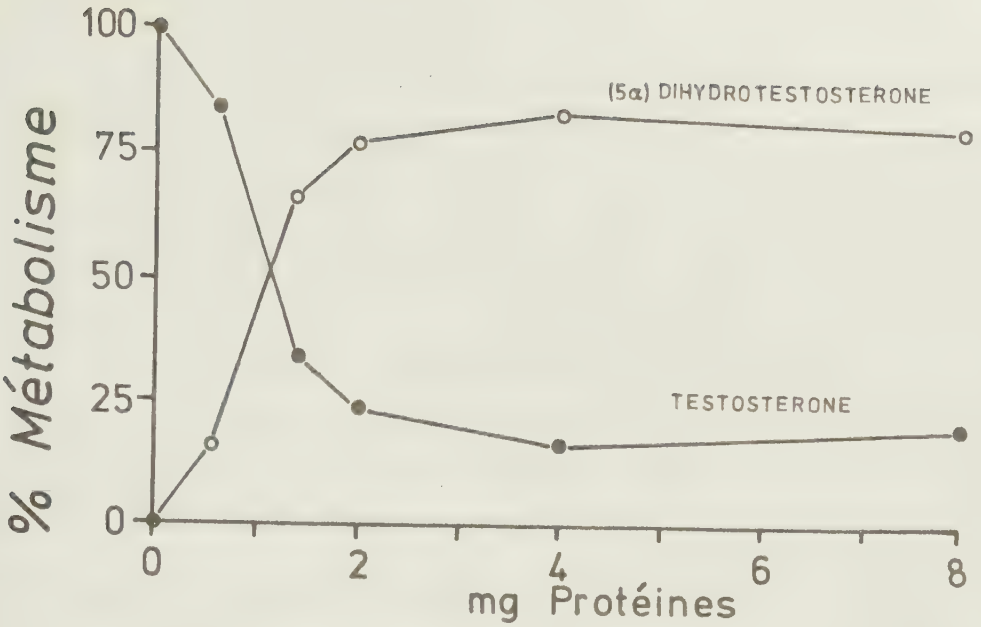
La figure 14 représente les taux de (5α) dihydrotestostérone obtenus à partir d'incubations de microsomes décongelés avec de la testostérone, lorsque l'on fait varier soit le temps d'incubation soit la quantité de protéines microsomales.

La (5α) dihydrotestostérone formée a été identifiée par cristallisation à activité spécifique constante après dilution isotopique (figure 10).

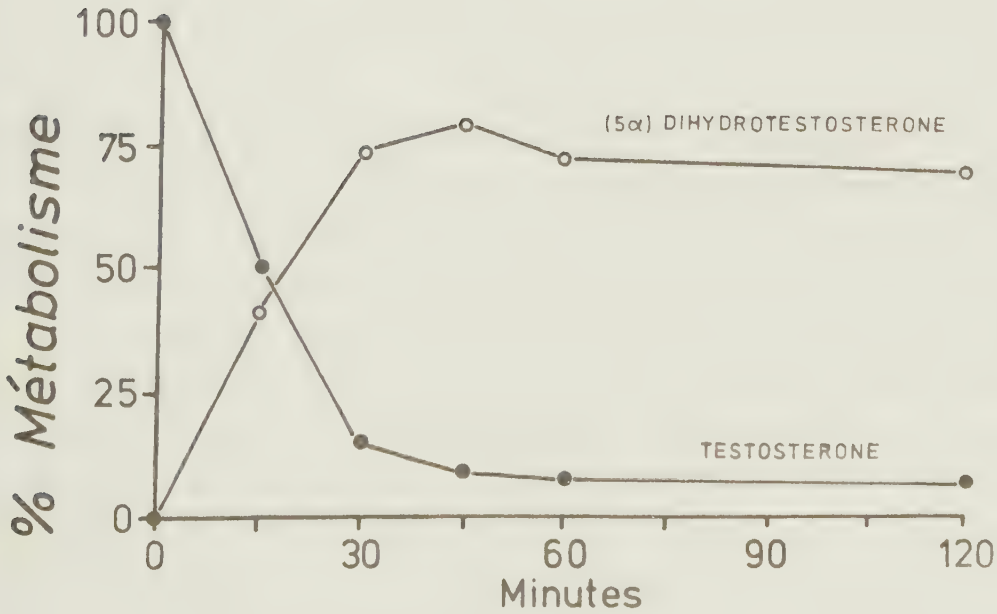
L'incubation avec de la testostérone 0,48 µM (2430 pmoles) en présence de NADPH a permis d'établir des vitesses de réaction enzymatiques pour la 5α réductase (tableau 16).

La centrifugation pendant deux heures à 105 000 g du surnageant du culot de microsomes a permis d'obtenir une deuxième fraction microsomale.

.../....



Des microsomes ayant été congelés 14 jours sont incubés aérobiquement pendant une heure à 37°C avec de la testostérone (243 pmoles, 0,048 µM) et en présence de NADPH et de saccharose 0,25 M.



Un gramme équivalent de microsomes (4 mg de protéines) ayant été congelés 14 jours, est incubé aérobiquement pendant une heure à 37°C avec de la testostérone (243 pmoles, 0,048 uM) et en présence de NADPH et de saccharose 0,25 M.

Figure 14 : Métabolisme de la testostérone par les microsomes de prostate humaine.

Cette deuxième fraction présentait une activité 5α réductasique moins importante que la première fraction.

L'incubation de (5α) dihydrotestostérone avec chacune de ces deux fractions microsomales a permis d'étudier la formation des dihydroxy-3α,17β (5α) androstane et dihydroxy-3β,17β (5α) androstane, et par là de reconnaître la présence des 3α et 3β oxydoréductases dans ces fractions.

Les résultats sont présentés dans le tableau 16. La première et la deuxième fraction microsomale présentent une activité de ces enzymes. Ceci prouve qu'avec la 5α réductase une partie des 3α et 3β oxydoréductases est sédimentée à 105 000 g.

Surnageants des centrifugations

Les surnageants des centrifugations contenaient du saccharose 0,25 M. Les incubations de cette fraction ont été effectuées dans des conditions identiques à celles utilisées pour les microsomes décongelés.

Après incubation de testostérone-4-^{14}C en présence de NADPH, la réduction en 5α du substrat était observée (tableau 16) pour le surnageant obtenu après 30 minutes de centrifugation.

Cette activité enzymatique était très faible dans le deuxième surnageant obtenu après 120 minutes de centrifugation à 105 000 g. Ceci mettait en évidence l'insolubilité de la 5α réductase.

Lorsque la (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C était utilisée comme substrat, les dihydroxy-3α,17β (5α) androstane et dihydroxy-3β,17β (5α) androstane étaient obtenus (tableau 16).

Dans des conditions d'incubation identiques, les activités des deux surnageants ne différaient pas d'une façon très significative. Ceci prouvait que les 3α et 3β oxydoréductases étaient présentes dans ces fractions et que leur vitesse de sédimentations était insuffisante pour les déposer en 120 minutes à 105 000 g.

.../...

TABLEAU 16

LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE TROIS ENZYMES DANS LA PROSTATE HYPERPLASIQUE HUMAINE

ENZYMES	5α REDUCTASE	3α OXYDOREDUCTASE	3β OXYDOREDUCTASE
PREPARATION INCUBEE	TESTOSTERONE	(5α) DIHYDROTESTOSTERONE	
1er CULOT, MICROSOMES	21,6	4,4	1,5
2ème CULOT, MICROSOMES	15,0	3,2	1,4
1er SURNAGEANT	1,6	5,7	2,7
2ème SURNAGEANT	1,2	4,0	2,3

Les résultats sont exprimés en pmoles par minute .
La fraction subcellulaire (4 mg de protéines) a été incubée [illegible] à 37°C avec le substrat (0,48 µM) en présence de NADPH . Les surnageants contenaient du saccharose 0 25 M .

DISCUSSION

En établissant la radiohomogénéité de trois radiométabolites de la testostérone obtenus par incubation avec diverses préparations de prostate humaine hyperplasique ou cancéreuse (figure 10), nous avons confirmé et complété les travaux de FARNSWORTH (16) et de SHIMIZAKI (52).

Nos expériences ont permis d'établir *in vitro* chez l'homme comme chez le chien la présence d'une 5α réductase et de 3α et 3β oxydoréductases. Ces résultats confirment ceux que nous avions déjà obtenus *in vivo* (chapitres I et III). En utilisant *in vitro* des broyats et des homogénats nous nous sommes éloignés des conditions existant *in vivo*.

Les broyats de tissu sont un mélange de cellules éclatées et intactes privées de l'apport normal d'oxygène et de nutriments. C'est un système fermé dans lequel les concentrations de substrat décroissent et celles des produits du métabolisme augmentent.

Ces processus peuvent influer sur la forme et les cinétiques des réactions biochimiques qui ont lieu dans la cellule et dans le milieu qui la baigne.

Pour l'étude de ces préparation *in vitro*, l'idéal serait d'utiliser les méthodes de superfusion introduites par TAIT et collaborateurs (108). Dans ce cas, la préparation serait irriguée par un courant continu du milieu contenant les substrats et les cofacteurs, et celui-ci serait prélevé et analysé au fur et à mesure de l'incubation.

Les homogénats, eux, sont encore plus éloignés de la structure physiologique intacte. Les cellules sont brisées et leur contenu est mis en contact avec les ions, les cofacteurs, et les substrats choisis du milieu.

L'homogénat peut être soumis à la centrifugation et les microsomes obtenus. Cette fraction contenant les restes du réticulum endoplasmique membraneux et les ribosomes ne possède plus la structure et l'organisation que l'on lui attribue après examen au microscope électronique.

Ces préparations de tissus n'ont été utilisées jusqu'à maintenant que pour la détermination qualitative des transformations de la testostérone et de ses métabolites.

Nous avons voulu mesurer quantitativement ces transformations. Ces mesures ne peuvent être effectuées que par des études cinétiques.

.../...

Pour cela des conditions rigoureuses doivent être remplies ; des vitesses initiales doivent être mesurées dans des conditions optimales pour les réactions enzymatiques étudiées.

Les résultats préliminaires que nous avons obtenus ont fourni une base solide pour la comparaison des activités enzymatiques et pour celle de différentes préparations entre elles.

Les résultats présentés dans le tableau 12 démontrent : une réduction importante de NADP+ par les broyats et les homogénats de tissu humain ; la spécificité de la 17β oxydoréductase pour NAD+ ; la nécessité d'ajouter du NADPH au milieu d'incubation pour reproduire les taux de transformation observés *in vivo*.

Nous avons donc incubé les préparations en présence de NADPH, bien que l'expression de la 17β oxydoréductase ne soit pas optimale dans ces conditions.

La figure 12 montre que les transformations de la testostérone-4-^{14}C en métabolites réduits en 5α et hydroxylés en 17β , par des homogénats d'hypertrophie bénigne de prostate humaine et en présence de NADPH, est linéaire en fonction du temps. Ces résultats devaient permettre de mesurer les vitesses initiales des réactions enzymatiques étudiées.

Les résultats permettant de comparer prostates humaines et canines sont présentés dans les tableaux 12,13 et 14. Les homogénats de prostate humaine hyperplasique différent des homogénats de prostate canine. La réduction en 5α est 4 fois supérieure chez ces premiers, et les réductions en 3α et 3β doubles chez les seconds.

Nous avons tenté d'isoler des fractions subcellulaires pour y étudier les enzymes qui métabolisent la testostérone (tableau 16). Les résultats obtenus complètent ceux présentés par CHAMBERLAIN et Collaborateurs (5,15) et par SHIMIZAKI (17).

Nous avons montré que les microsomes qui sédimentent lentement sont une source importante de 5α réductase dans la prostate humaine. Cette enzyme n'admet que le NADPH comme cofacteur.

Par contre les 3α et 3β oxydoréductases admettent NADH et NADPH comme cofacteurs et pourraient correspondre à des lipoprotéines de haut poids moléculaire ou à des microsomes sédimentant très lentement.

.../...

Etudiant les effets de divers stéroïdes sur des cultures de prostate ventrale de rat, BAULIEU et Collaborateurs (13,25) ont mis en évidence que le dihydroxy-3β,17β (5α)androstane maintient la sécrétion et la forme des cellules épithéliales mieux que la testostérone.

Nous avons donc entrepris d'étudier la conversion de la testostérone et de la (5α) dihydrotestostérone en (5α) androstanediols épimériques dans les organes sexuels secondaires de plusieurs espèces.

Les résultats de ces expériences sont présentés dans le tableau 15. On y observe une prédominance marquée du dihydroxy-3α,17β (5α) androstane pour les broyats et les homogénats de prostate humaine et de rat.

Par contre, la prédominance du dihydroxy-3β,17β (5α) androstane est observée uniquement pour les broyats de prostate canine et non pour les homogénats. Ces résultats suggèrent qu'un procédé d'homogénisation moins drastique devrait être employé pour éviter la dénaturation de la 3β oxydoréductase dans les préparations canines.

La (5α) dihydrotestostérone est liée sélectivement par les noyaux de prostate ventrale du rat (7,13) et par des récepteurs nucléaires et cytoplasmiques (12,41). Si cette liaison d'une protéine avec la (5α) dihydrotestostérone s'effectue *in vitro*, deux conséquences directes peuvent être envisagées :

Tout d'abord, la (5α) dihydrotestostérone formée à partir de la testostérone ne pourrait avoir d'effet rétroactif sur l'enzyme qui la forme, une partie étant liée au récepteur, l'autre servant de substrat aux 3α et 3β oxydoréductases.

Ensuite, l'expression de ces deux enzymes serait incomplète ; la (5α) dihydrotestostérone liée au récepteur ne pourrait être métabolisée, et les activités mesurées pour les 3α et 3β oxydoréductases ne seraient que les mesures de la (5α) dihydrotestostérone libre, dépendant de la constante de dissociation du complexe (5α) dihydrotestostérone-récepteur.

Pour ces raisons, il est actuellement impossible de calculer les constantes qui régissent les réactions :

$$\text{Testostérone} \xrightarrow{K1} \text{(5α) dihydrotestostérone} \xrightarrow{K2+K3} \text{(5α) androstanediols}$$

On a seulement observé que K1 est plus grand que K2 + K3.

La liaison de la (5α) dihydrotestostérone à un récepteur pourrait expliquer les grandes quantités de ce métabolite à activité androgénique

.../...

certaine, qui sont formées dans les organes-cibles à partir de la testostérone.

Une étude complète de ces phénomènes devrait permettre d'établir sûrement les contributions réelles des enzymes au métabolisme de la testostérone.

La (5α) dihydrotestostérone et les(5α) androstanediols épimériques sont soit des androgènes actifs *per se*, soit des précurseurs de forme actives (43,63). Le cas semble être assez définitif pour la (5α) dihydrotestostérone, mais il est bien moins développé pour les diols.

La (5α) dihydrotestostérone pourrait être à l'origine d'une action au niveau de la transcription de l'ARN sur l'ADN nucléaire, et le dihydroxy-3β,17β (5α) androstane contrôler la synthèse des protéines sur les complexes contenant l'ARN ribosomal. La (5α) réduction de la testostérone au niveau des microsomes formerait le substrat nécessaire à l'apparition de diols actifs.

L'étude des récepteurs de ces métabolites et l'isolement des enzymes présents dans les tissus devraient permettre de mieux connaître les mécanismes qui déterminent la sensibilité des organes-cibles.

Les mécanismes contrôlant les transformations de la testostérone en composés androgéniquement actifs pourraient avoir une influence importante sur le développement de l'hyperplasie bénigne et du cancer de la prostate.

.../...

CHAPITRE V

ETUDE DES METABOLITES POLAIRES DE LA TESTOSTERONE DANS LES GLANDES PERI-ANALES DU CHIEN

INTRODUCTION

Les glandes périanales du chien sont des glandes sébacées dont la fonction est inconnue. Elles sont localisées dans le derme, autour de l'orifice anal externe chez les deux sexes, et se développent au moment de la puberté.

Ces glandes ont aussi été nommées glandes hépatoïdes à cause de leur structure semblable à celle du foie (99). Les glandes périanales donnent couramment naissance chez le mâle à des adénomes qui régressent après castration (100). Ces glandes sont considérées comme des organes cibles pour les androgènes chez l'adulte.

Des expériences préliminaires explorant le métabolisme de la testostérone dans ces tissus ont mis en évidence une quantité importante de métabolites polaires.

Les propriétés chromatographiques de certains de ces métabolites étaient semblables à celles observées sur les métabolites polaires de la testostérone obtenus dans les prostates canines et humaines.

On a donc tenté d'utiliser les glandes périanales du chien pour la production massive de ces métabolites polaires afin de tenter leur identification, pour ensuite appliquer les méthodes utilisées à l'identification des métabolites polaires de la testostérone formés dans la prostate.

Ces travaux ont été publiés sous forme d'abstract : (R.F. MORFIN, I. LEAV, P. OFNER and J.C. ORR (Sponsor : L.L. ENGEL) C_{19}-steroid metabolism by normal and neoplastic Canine perianal glands. Federation Proceedings 29 : 247, abstract n°2, 1970.

OBTENTION ET SEPARATION DES METABOLITES POLAIRES

In vivo

Au cours des expériences d'injection lente de la testostérone dans les artères afférentes à la prostate (voir chapitre I), l'hormone injectée passe dans les artères périanales et rectales (figure 1). L'artère rectale irrigue les tissus contenant les glandes périanales.

Ces tissus ont été prélevés à la fin de l'expérience en même temps que la prostate, et ont subi des procédés d'extraction en tout point similaires à ceux décrits pour la prostate dans le chapitre I.

.../...

Les tissus prélevés pesaient 19,1 g, et 276 000 dpm leur étaient associés (chien n°V).

Après chromatographie sur couche mince de silice G dans le système n°8, 52 % de la radioactivité restaient associés à des métabolites polaires. Localisée par autoradiographie, la zone radioactive était ensuite éluée du chromatogramme.

In vitro

Du tissu périanal était obtenu sur des chiens normaux ; son prélèvement était fait après un nettoyage intensif de la zone correspondante. Le tissu débarrassé des poils, des adhérences musculaires et dermiques, était broyé finement avec des ciseaux. La contamination bactérienne était contrôlée et le broyat obtenu utilisé pour des incubations *in vitro*.

Le broyat (0,2 g) était incubé pendant 30 minutes à 37°C dans une solution 0,48 µM du substrat (2 430 pmoles) en présence de NADPH (34 µmoles).

Les réactions enzymatiques étaient arrêtées par addition d'acétate d'éthyle et congélation à -18°C. Les extraction étaient conduites d'une manière identique à celle décrite dans le chapitre II.

Les radiométabolites contenus dans les extraits étaient analysés par chromatographie sur couche mince de silice G dans le système n°8. Les composés polaires correspondaient respectivement à 20,1 et à 63,4 % de la radioactivité extraite lorsque la testostérone-4-^{14}C ou la (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C étaient utilisées comme substrats.

METHODES UTILISEES POUR L'IDENTIFICATION DES METABOLITES POLAIRES

Chromatographie sur couche mince

La séparation des divers métabolites polaires était effectuée par CCM sur silice G. Les systèmes n°1,2,3 et 4 ont été utilisés. Les migrations obtenues étaient comparées avec celles de substances authentiques.

Oxydation, Acétylation, Cristallisations

Ces trois procédés (décrits dans les méthodes communes de cet exposé) ont été utilisés pour l'identification des composés. Les propriétés chromatographiques des dérivés oxydés et acétylés ont été comparées à celles de composés authentiques par CCM respectives dans les systèmes n°7 et 9.

.../...

Utilisation de substrats doublement marqués

La présence de composés hydroxylés en 7α était soupçonnée. On en a déduit que si l'on incubait de la testostérone ou de la (5α) dihydrotestostérone tritiée en 7α,le tritium devait disparaître des stéroïdes hydroxylés en 7α.

On a donc utilisé comme substrats un mélange de testostérone-4-^{14}C et de testostérone-7α^{3}H du commerce (NEN) dans un rapport $^{3}H/^{14}C$ déterminé.

La (5α) dihydrotestostérone doublement marquée était obtenue à partir de cette testostérone selon le procédé décrit dans les méthodes communes, et son rapport $^{3}H/^{14}C$ était le même que celui de la testostérone.

Spectrographie de masse

Docteur L.L. Engel a mis ses laboratoires du Massachusetts General Hospital (Boston) à notre disposition. Docteur J.C. ORR nous a aidé dans ses laboratoires à l'analyse de nos composés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrographie de masse.

L'appareil (LKB 9000) utilisait l'hélium comme gaz vecteur et était équipé d'une colonne de Gas chrom Q à 1 % d'OV-1 chauffée à 185-187°C. L'injection solide des échantillons était pratiquée (101,102).

Le stéroïde à analyser, adsorbé sur une gaze d'acier inoxydable était introduit dans le compartiment de chauffage à 253°C à l'aide d'un aimant. Le séparateur moléculaire du spectrographe de masse était maintenu à 250°C et la source d'ion à 270°C. Le courant d'ionisation était de 50 µA et l'énergie d'ionisation de 70 eV au cours du déroulement des spectres de masse.

De façon à identifier les molécules analysées sur les différents spectres de masse un substrat marqué au deutérium était nécessaire. Docteur ORR a synthétisé de la testostérone-7β ^{2}H (deutérium = 44,9%) que nous avons utilisée pour la préparation de (5α) dihydrotestostérone-7β ^{2}H .

Pour la G.L.C. couplée à la spectrographie de masse, des quantités de métabolites polaires de l'ordre du microgramme étaient nécessaires. Un mélange de 0,7 µg de (5α) dihydrotestostérone-4-^{14}C et 100 µg de (5α) dihydrotestostérone-7β^{2}H était utilisé pour les incubations dans des conditions identiques à celles décrites plus haut. Dans ce cas, 8 % du substrat était transformé en composés polaires.

.../...

La mesure directe du deutérium devait permettre de savoir si dans les métabolites polaires la position 7β restait intacte et de confirmer l'origine des molécules analysées.

Synthèse du trihydroxy-3β,7α,17β (5α) androstane

Ce stéroïde trihydroxylé a été synthétisé de la manière suivante : à une solution de lithium (12 mg) dans de l'ammoniac liquide (4 ml) étaient ajoutés 400 µg de dihydroxy-7α,17β-androstèn-4-one,3 (7α-hydroxytestostérone) (103,104).

Après 30 minutes, du chlorure d'ammonium et de l'éthanol étaient ajoutés jusqu'à ce que la solution bleue devienne incolore. Après évaporation de l'ammoniac liquide le résidu gris était extrait (10 ml d'acétate d'éthyle/10 ml d'eau) et la phase organique lavée avec de l'eau (1 ml) jusqu'à neutralité.

Chaque phase aqueuse était extraite à nouveau avec de l'acétate d'éthyle (10 ml). Les solutions d'acétate d'éthyle étaient filtrées sur laine de verre de façon à éliminer une écume brune.

Le triol obtenu, purifié par CCM sur silice G dans le système n°2 était soumis à la spectrographie de masse. Un pic homogène à m/e 308 était obtenu. Un pic plus faible à m/e 290 était dû à la déhydratation partielle du triol dans le compartiment de chauffage de l'appareil.

Obtention de la (5α) androstanetrione-3,7,17

Ce stéroïde était obtenu par oxydation chromique de trihydroxy-3β,7β,17β (5α) androstane. Le spectrogramme de masse de ce produit présentait un pic à m/e 302.

RESULTATS

METABOLITES POLAIRES DE LA TESTOSTERONE *IN VIVO*

Les métabolites polaires correspondaient à 52 % des métabolites totaux. Leur mélange était soumis à la CCM sur silice G dans le système n°2.

Après autoradiographie, deux zones radioactives importantes étaient mises en évidence. L'une d'elles possédait les mêmes propriétés chromatographiques que le trihydroxy-3β,7α 17β (5α) androstane et correspondait

.../...

à 18,9 % des métabolites totaux ; l'autre se comportait comme le dihydroxy-3β,7α (5α)androstanone-17 et correspondait à 20,1 % des métabolites totaux.

Les propriétés chromatographiques de ces deux métabolites étaient vérifiées en CCM sur silice G dans les systèmes n°1 et 3.

Après oxydation chromique, chacun des deux composés soumis à la CCM sur silice G dans le système n°8, migrait de pair avec la (5α) androstanetrione-3,7,17.

L'acétylation n'apportait pas de renseignements bien précis, sinon que l'acétate du triol était moins polaire que l'acétate du céto-diol.

Le métabolite isopolaire avec le trihydroxy-3β,7α,17β (5α) androstane était soumis à la CCM sur silice G dans le système n°5 (chromatographie horizontale pendant 5 heures en utilisant un montage de chromatographie continue).

Ce système permet de séparer le trihydroxy-3β,7α,17β (5α) androstane de son épimère en 7β (105). Aucune trace significative de trihydroxy-3β,7β,17β (5α) androstane n'a été observée sur l'autoradiographie du chromatogramme.

METABOLITES POLAIRES DE LA TESTOSTERONE *IN VITRO*

De la radioactivité extraite des incubations, 20,1 % correspondaient aux métabolites polaires. Ceux-ci étaient soumis à la CCM sur silice G dans le système n°2.

De 30 à 50 % des métabolites polaires correspondaient au trihydroxy-3β,7α,17β (5α) androstane. Une diminution du rapport $^{3}H/^{14}C$ initial était observée dans cette zone lorsque le substrat utilisé était de la testostérone doublement marquée au ^{3}H en 7α et au ^{14}C en 4.

On calculait que 30 % du tritium avait disparu. Lorsque ce composé doublement marqué était oxydé, la perte de tritium s'élevait à 60 %.

Le produit d'oxydation chromique, marqué au ^{14}C seul, possédait une mobilité chromatographique similaire à la (5α) androstanetrione-3,7,17 non radioactive.

Ce composé était utilisé pour la dilution isotopique, et le mélange cristallisé. Trois cristallisations étaient nécessaires pour obtenir une activité spécifique constante (tableau 17).

.../...

TABLEAU 17

IDENTIFICATION DE LA (5α) ANDROSTANETRIONE-3,7,17 PAR CRISTALLISATION A ACTIVITE SPECIFIQUE CONSTANTE

ACTIVITE SPECIFIQUE	CRISTALLISATIONS	1ère	2ème	3ème
1 170	EAUX MERES	1 400	1 250	990
	CRISTAUX	1 010	1 010	1 030

Les activités specifiques sont exprimées en dpm / µmole.
Les systèmes de cristallisation suivants étaient utilisés :
1er = *Acétate d'éthyle / nHexane*
2me = *Acétone / nHexane*
3me = *Acétone / eau*

METABOLITES POLAIRES DE LA (5α) DIHYDROTESTOSTERONE *IN VITRO*

Plus de 60 % de la radioactivité extraite des incubations correspondait à des stéroïdes en $C_{19}O_3$.

Après CCM sur silice G dans le système n°2, on observait sur l'autoradiographie deux zones radioactives importantes. La plus polaire correspondait au trihydroxy-3β,7α,17β (5α) androstane, l'autre moins polaire au dihydroxy-3β,7α (5α) androstanone-17. Chacune de ces zones contenait environ 25 % de la radioactivité extraite.

Une diminution du rapport $^{3}H/^{14}C$ était observée dans chacune de ces zones lorsque le substrat utilisé était de la (5α) dihydrotestostérone doublement marquée au ^{3}H en 7α et au ^{14}C en 4. On calculait que 30 % du tritium avait disparu. Cette perte était similaire à celle observée avec la testostérone.

SPECTROGRAPHIE DE MASSE

Après incubation de 100 µg de (5α) dihydrotestostérone marquée au deutérium en 7β (44,9 %) et au ^{14}C en 4, 4 µg de composé ayant les propriétés chromatographiques du trihydroxy-3β,7α,17β (5α) androstane, et 2 µg de composé ayant les propriétés chromatographiques du dihydroxy-3β, 7α (5α) androstanone-17 étaient obtenus. Un duplicata de cette expérience et des analyses qui suivent a été effectué.

La moitié de la fraction correspondant au triol était oxydée. Le triol, son produit d'oxydation et le céto-diol étaient alors soumis à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrographie de masse.

Etalonnage

L'étalonnage se faisait à l'aide de stéroïdes authentiques purs :
- la (5α) dihydrotestostérone contenant 44,9 % de deutérium, (temps de rétention = 1,0 en GLC, masse = double pic à m/e 290 + 291 dû au deutérium).
- le trihydroxy-3β,7α,17β (5α) androstane, (temps de rétention = 1,7 en GLC, masse = pic à m/e 308 et à m/e 290 ($M-H_2O$))
- la (5α) androstanetrione-3,7,17, (temps de rétention = 1,4 en GLC, masse = pic à m/e 302)

.../..

Mesures

1) Le composé deutéré assimilé avec le triol était introduit (injection solide) dans l'appareil de GLC. Deux pics étaient obtenus sur le chromatogramme. Le premier pic avait un temps de rétention de 1,1 et ne contenait pas de deutérieum ; il s'agissait donc d'une impureté ne provenant pas de la (5α) dihydrotestostérone deutérée incubée.

Le deuxième pic avait un temps de rétention de 1,7 et coïncidait avec l'étalon. Trois spectres de masse étaient obtenus sur ce pic. Les trois spectres indiquaient 35,1, 40,4 et 35,1 % de deutérium (moyenne 36,90 %). Le double pic à m/e 290 + 291 ($M-H_2O$) était utilisé pour ces mesures ; le double pic à m/e 308 + 309 était nettement visible mais sa hauteur insuffisante pour une détermination précise du contenu en deutérium.

Un troisième double pic très marqué était observé à m/e 272 + 273 ($M-2H_2O$). Le contenu en deutérium y était de 38,3 %. On déduisait de ces mesures que 82-85 % de deutérium initialement en 7β était maintenu dans la molécule du triol.

2) Le produit d'oxydation du triol deutéré était injecté dans l'appareil de GLC. Au temps de rétention 1,4, un pic apparaissait sur la chromatogramme. Deux spectres de masse étaient obtenus. Un pic à m/e 302 était observé sur l'un et l'autre mais les doubles pics dus au deutérium étaient absents.

Ceci prouvait que le groupement hydroxyl introduit sur le substrat au cours des incubations se trouvait en position 7α.

3) Le céto-diol deutéré était injecté dans l'appareil de GLC ; deux pics étaient obtenus sur le chromatogramme, l'un au temps de rétention de 1,1 dont le spectre de masse ne présentait pas de double pic, l'autre au temps de rétention de 1,6.

Le second pic intermédiaire entre le trione (rétention = 1,4) et le diol (rétention = 1,7) pouvait correspondre au dihydroxy-3β,7α (5α) androstanone-17. Le spectre de masse présentait un double pic à m/e 306 - 307 confirmant ce résultat. D'autre part, ce céto-diol possédait des propriétés chromatographiques similaires à celles du dihydroxy-3β ,7α (5α) androstanene-17 , et différentes de celles du dihydroxy-3α,7β (5α) androstanone-3 .

DISCUSSION

Les résultats de ces travaux préliminaires ont soulevé des questions concernant la validité des méthodes mises en oeuvre. En effet, on observe une différence entre les résultats de la spectrographie de masse et ceux obtenus par mesure de la perte du tritium en position 7α sur la molécule de substrat.

Dans le premier cas, 85 % du deutérium est retenu en position 7β par le trihydroxy-3β,7α,17β (5α) androstane. Ce deutérium est entièrement perdu après oxydation chromique du triol en (5α) androstanetrione-3,7,17. Ceci prouve la position en 7α d'un groupement hydroxylé sur la molécule.

Dans le deuxième cas, nous avons mesuré 30 % de perte de tritium sur le composé correspondant au trihydroxy-3β,7α,17β (5α) androstane. Cette perte de tritium était portée à 60 % après oxydation chromique du composé.

Ceci nous a fait douter de la position du tritium sur la molécule marquée du commerce (testostérone-7α ^{3}H de NEN), d'autant plus que les résultats obtenus dans le premier cas prouvaient la 7α hydroxylation, et que les pertes de tritium après oxydation chromique indiquaient la présence de tritium en position 7β.

Nous avons donc tenté de localiser le tritium sur la molécule de testostérone utilisée.

Les pertes de tritium observées indiquaient que sur la molécule du substrat, 30 % de l'isotope radioactif étaient localisés en 7α et 30 % en 7β. Il restait donc à localiser les 40 % restant.

De l'hydroxy-17β androstadién-4-6-one-3 était formée par traitement de la testostérone-7α ^{3}H au chloranil. La formation de la double liaison entre les carbones 6 et 7 entraînait la perte de deux hydrogènes, l'un du carbone 6, l'autre du carbone 7.

Cette perte d'hydrogène représentait 50 % du tritium total. Le tritium perdu sur le carbone 7 correspondant à 30 %, on en déduisait que la différence, soit 20 %, correspondait au tritium perdu par le carbone 6.

On pouvait donc conclure que le tritium marquant la molécule de testostérone était réparti de la façon suivante : 30 % en position 7α , 30 % en position 7β , 20 % en position 6α et 20 % en position 6β.

.../...

Les résultats obtenus permettent d'affirmer la présence d'une 7α hydroxylase dans les glandes périanales du chien. Le trihydroxy-3β,7α, 17β (5α) androstane étant le métabolite principal de la testostérone, il faut également reconnaître à ces glandes la capacité de réduire l'hormone en 5α et en 3β . On notera cependant que parmi les métabolites en $C_{19}O_2$, aucun ne semblait correspondre à la (5α) dihydrotestostérone. Par contre leur presque totalité correspondait au dihydroxy-3β,17β (5α) androstane (109).

Comparativement, la (5α) dihydrotestostérone est plus rapidement métabolisée dans les glandes périanales que dans la prostate du chien où ce métabolite a tendance à s'accumuler. Ce fait soulève la question du mode d'action androgénique de la (5α) dihydrotestostérone. Il semblerait que, soit son accumulation, soit son métabolisme déterminent la réponse du tissu. Dans un cas comme dans l'autre ceci ferait de la prostate et des glandes périanales deux organes cibles complètement différents.

Les méthodes mises en oeuvre pour l'identification du trihydroxy-3β,7α,17β (5α) androstane dans les glandes périanales du chien seront appliquées à l'identification des métabolites polaires obtenus dans la prostate humaine et canine.

On a déjà remarqué que les métabolites polaires principaux de la prostate possédaient des propriétés chromatographiques comparables à celles de ceux isolés dans les glandes périanales. D'autre part, l'oxydation chromique de ces métabolites produisait un composé ayant des propriétés chromatographiques identiques à celles de la (5α) androstanetrione-3,7,17 (voir chapitre I). Enfin, on observait chez les métabolites polaires de la prostate une perte de tritium de 20 % après incubation avec de la testostérone doublement marquée au ^{3}H en 7α et au ^{14}C en 4. Du fait de la pluralité du marquage de la testostérone tritiée utilisée, il n'était pas possible de déterminer avec exactitude la position du groupement hydroxyle introduit dans la molécule. Les métabolites polaires de la testostérone dans la prostate doivent être tout d'abord produits en quantité suffisante au cours d'incubations à l'échelle préparative pour être étudiés par la spectrographie de masse.

Des quantités importantes de stéroïdes de référence doivent être synthétisées de façon à identifier ces métabolites par cristallisation à activité spécifique constante.

.../...

CONCLUSION

Les conditions physiologiques nécessaires à l'étude du métabolisme de la testostérone par la prostate ont été établies par des expériences *in vivo* chez l'homme et chez le chien. Ces conditions ont par la suite été appliquées à des expériences *in vitro*.

Le métabolisme de la testostérone a été comparé *in vivo* et *in vitro* sur des prostates canines normales et des prostates humaines hypertrophiques ou cancéreuses. Les résultats obtenus *in vitro* ne différaient pas significativement de ceux obtenus *in vivo*.

SIITERI et WILSON (106) ont montré que la prostate humaine normale contenait environ 4 fois moins de (5α)dihydrotestostérone que la prostate humaine hyperplasique. Nos résultats *in vitro* indiquent une différence comparable entre la prostate canine normale et celle hyperplasique de l'homme. Il sera donc nécessaire d'obtenir des échantillons de prostate humaine normale et de les comparer selon nos méthodes avec les tissus que nous avons déjà étudiés. Les résultats de ces comparaisons devraient nous permettre de décider jusqu'à quel titre la prostate canine peut être étudiée en tant que modèle de la prostate humaine.

Les enzymes de la chaîne métabolique de la testostérone ont été étudiées *in vitro*. Par l'utilisation de substrats appropriés et l'étude cinétique des transformations, les activités de ces enzymes ont pu être comparées. Une différence était observée pour les 3α et 3β oxydoréductases. La 3α oxydoréductase avait une activité supérieure à celle de la 3β oxydoréductase chez l'homme, alors que l'activité 3β oxydoréductasique prédominait chez le chien.

Le rapport des (5α) androstanediols épimères formés pourrait avoir une signification dans l'expression de l'activité androgénique de la testostérone dans la prostate. Nous avons discuté cette hypothèse. Pour la prouver il faudrait connaître l'activité androgénique de ces (5α) androstanediols sur les tissus prostatiques humains et canins. Des tests utilisant la culture d'organe selon LASNITZKI et BAULIEU, ou d'autres critères d'activité androgéniques pourraient être développés. La mise au point de ces tests permettrait aussi de connaître, dans le tissu concerné, l'action des différents métabolites que nous avons mis en évidence et d'étudier des mécanismes d'inhibition.

.../...

Nous avons tenté de localiser certaines des enzymes métabolisant la testostérone dans des sous-fractions cellulaires de la prostate humaine. Nos expériences ont montré que la 5α réductase était localisée principalement au niveau des microsomes. Nous n'avons pas recherché la 5α réductase dans les fractions nucléaires, étant dans l'impossibilité d'obtenir des noyaux biologiques actifs libres de toute attache cytoplasmique ou microsomale.

Les 3α et 3β oxydoréductases ont été localisées dans le cytoplasme cellulaire. L'essai de ces enzymes *in vitro* a permis d'étudier les cofacteurs qui leur étaient nécessaires. La 5α réductase microsomale a montré une spécificité marquée pour le NADPH. Les 3α et 3β oxydoréductases semblaient moins spécifiques et acceptaient indifféremment NADH et NADPH comme cofacteurs. Par contre la 17β oxydoréductase n'admettait que NAD+/NADH à l'expression de son activité.

La localisation de chacune de ces enzymes sera par la suite comparée à celle des stéroïdes qui leur correspondent : après injection d'hormone radioactive *in vivo* selon les procédés décrits, on tentera de localiser les radiométabolites dans les différentes fractions subcellulaires de la prostate. La même expérience devrait aussi permettre l'étude de la liaison sélective de certains métabolites avec les protéines ou les complexes lipoprotéiques cellulaires.

La testostérone est la forme hormonale sécrétée et circulante dans l'organisme. Ce sont des métabolites spécifiques de cette hormone qui ont une activité androgénique dans les organes cibles. Les travaux de MAUVAIS-JARVIS ont étroitement relié les métabolites hydroxylés en 17β à l'activité androgénique développée dans les tissus cibles. Parmi ceux-ci, la (5α) dihydrotestostérone reconnue active s'accumule. En effet,dans la prostate, la réduction en 5α de la testostérone est plus importante à elle seule que toutes les autres activités enzymatiques.

Les glandes périanales du chien que nous avons sommairement étudiées, ne présentent pas des quantités aussi remarquables de (5α) dihydrotestostérone, ce composé étant rapidement converti en trihydroxy-3β,7α,17β (5α) androstane. Les glandes périanales sont cependant des organes cibles dont la fonction est inconnue. On ajoutera à ces observations que la (5α) dihydrotestostérone n'a pas été trouvée dans la prostate du taureau. Cette absence de la (5α) dihydrotestostérone dans certains organes cibles amène

.../...

à douter d'une activité androgénique que pourrait présenter ce stéroïde *per se*. Il semblerait donc qu'un métabolite (encore inconnu) de la (5α) dihydrotestostérone soit à l'origine de l'activité androgénique attribuée à ce stéroïde.

Une corrélation directe doit cependant exister entre l'activité androgénique normale, et la présence de stéroïdes hydroxylés en 17β . En effet, la castration ou le traitement par un estrogène changent la voie métabolique réductive de la testostérone dans la prostate en une voie métabolique oxydative ; l'une produisant des métabolites hydroxylés en 17β , l'autre des métabolites 17-cétoniques. Ces métabolismes ont été comparés avec ceux observés dans la vessie ou les glandes salivaires *in vivo*. La prostate après traitement par un estrogène ou castration métabolise la testostérone par une voie oxydative comme ces organes "non cibles".

Ceci prouve l'importance androgénique des métabolites hydroxylés en 17β , mais non celle de la (5α) dihydrotestostérone. L'étude de l'ultrastructure cellulaire de la prostate avant et après traitement a permis de corréler les changements de voie métabolique à la modification des structures subcellulaires.

Nous nous proposons au cours d'expériences futures d'étudier : i) la localisation de l'estradiol dans les sous-fractions cellulaires de la prostate de chiens traités. ii) la capacité de rétention et le métabolisme de la testostérone et de la (5α) dihydrotestostérone dans la prostate de ces mêmes chiens.

Les résultats des recherches à venir devraient apporter une connaissance complète du métabolisme de l'hormone mâle dans la prostate *in vivo* et *in vitro*.

Cette connaissance est nécessaire pour la recherche et la compréhension des mécanismes d'action des androgènes dans les organes cibles.

L'importance de ces mécanismes ne saurait échapper.

La recherche des agents biologiques ou chimiques déterminant leur inhibition sélective serait alors entreprise car les développements hyperplasiques de la prostate chez l'homme et chez le chien pourraient être dus à des dérèglements du métabolisme hormonal.

BIBLIOGRAPHIE

1 - VAN DAM M., DE KLEUVER G.J. et DEHEUS J.C.
J. Chromatog. 4 : 26, 1960
(cité p. 10)

2 - DJERASSI C., ENGLE R.R. et BOWERS A.
J. Org. Chem. 21 : 1547, 1956
(cité p. 11)

3 - BARTON D.H.R., EVANS R. M., HAMLET J.C., JONES P.C. et WALKER T.
J. Chem. Soc. (London) 747, 1954
(cité p. 12)

4 - AXELROD L.R., MATTHIJSSEN C., GOLDZIEHER J.W. et PULLIAM J.E.
Acta Endocr. (kobenhavn) 49 (suppl. 99) : 7, 1965
(cité p. 13,28)

5 - CHAMBERLAIN J., JAGARINEC N. et OFNER P.
Biochem. J. 99 : 610, 1966
(cité p. 4,14,23,47,49,65,88,89,91,118

6 - OFNER P.
Vitamins Hormones (N.Y.) 26 : 237, 1968
(cité p. 2,3,6,15,23,46,47,89)

7 - BRUCHOVSKY N. et WILSON J.D.
J. Biol. Chem. 243 : 2 012, 1968
(cité p. 15,23,43,46,65,72,73,119)

8 - MAUVAIS-JARVIS P., GUILLEMANT S., CORVOL P., FLOCH H.H. et BARDOU L.
Steroids 16 : 173, 1970
(cité p. 15,84)

9 - CHAMBERLAIN J., JAGARINEC N. et OFNER P.
Steroids (suppl. II) : 1, 1965
(cité p. 15)

10 - BOWERS A., RINGOLD H.J. et DENOT E.
J. Amer. Chem. Soc. 80 : 6115, 1958
(cité p. 18)

.../...

11 - LEAV I., et LING G.
Cancer 22 : 1329, 1968
(cité p. 23,47)

12 - BRUCHOVSKY N. et WILSON J.D.
J. Biol. chem. 243 : 5933,1968
(cité p. 46, 89, 119)

13 - BAULIEU E.E., LASNITZKI I. et ROBEL P.
Nature (London) 219 : 1155, 1968
(cité p. 6,23,42,43,66,84,89,119)

14 - ALIAPOULIOS M.A., CHAMBERLAIN J., JAGARINEC N. et OFNER P.
Biochem. J. 98 : 15 P, 1965 (abstract)
(cité p. 3,25)

15 - GLOYNA E.E. et WILSON J.D.
J. Clin. Endocr. 29 : 970,1969
(cité p. 25, 47,118)

16 - FARNSWORTH W.E. et BROWN J.R.
J. Ame. Med. Assoc. 183 : 436, 1963
(cité p. 4,23,88,117)

17 - SHIMIZAKI J., KURIHARA H., ITO Y., et SHIDA K.
Gumma J. Med. Sci. 14 : 326,1966
(cité p. 23,65,66,118

18 - PURDY R.H., GOLDMAN N.L. et RICHARDSON G.S.
J. Biol. Chem. 240 : 1573, 1965
(cité p. 28)

19 - AXELROD L.R., MILLER L.L. et HERLING F.
J. Biol. Chem. 219 : 455, 1956
(cité p. 41)

20 - OFNER P., et VENA R.
Communication privée
(cité p. 41)

21 - ROSENKRANTZ H. et ILEVSKI V.
Amer. J. Vet. Res. 25 : 47, 1964 (cité p. 42)

22 - PEARLMAN W.H. et PEARLMAN M.R.J.
J. Biol.Chem. 236 : 1321, 1961 (cité p. 3,42)

23 - HARDING B.W. et SAMUELS L.T.
Endocrinology 70 : 109, 1962 (cité p. 3,4,42)

.../...

24 - HILGAR A.G. et HUMMEL D.J.
Endocrine bioassay Data, Cancer Chemotherapy Nat. Ser. Center NIH, Issue I, 1964 (cité p. 5,42,43)

25 - BAULIEU E.E., LASNITZKI I et ROBEL P.
Programm 51st Meeting Amer. Endocrine Society, New York, 1969, abstract 18 (cité p. 6,43,66,119)

26 - FARNSWORTH W.E. et BROWN J.R.
In VOLLMER E.P. et KAUFFMANN (eds), Nat. Cancer. Inst. Monogr. 12 : 323, 1963 (cité p. 43)

27 - ANDERSON K.M. et LIAO Sh.
Nature (London) 219 : 277, 1968
(cité p. 23,43,46,65)

28 - PATTEN B.M.
Human Embryology, ed. 3, Mc Graw-Hill New York, 1968, pp 84, 468, 496
(cité p.44)

29 - GIER H.T. et MARION G.B.
Biology of reproduction 1 : 1,1969 (cité p.44)

30 - WEINER A.L., OFNER P. et SWEENEY E.A.
Endocrinology, 87 : 406, 1970 (cité p. 44)

31 - MAUVAIS-JARVIS P., FLOCH H.H. et BERCOVICI J.P.
J. Clin. Endocr. 28 : 460, 1968
(cité p. 5,44,46,89)

32 - MAUVAIS-JARVIS P., BERCOVICI J.P. et GAUTHIER F.
J. Clin. Endocr. 29 : 417, 1969
(cité p. 44,46,72,86)

33 - BAULIEU E.E., MAUVAIS-JARVIS P.
J. Biol. Chem. 239 : 1569, 1964
(cité p. 5,44,60,85,89)

34 - HUGGINS C. et WEBSTER W.O.
J. Urol. 59 : 258, 1948
(cité p. 2,46)

35 - KINSON G.A. et KOCHAKIAN C.D.
Amer. J. Physiol. 206 : 443, 1964 (cité p. 23)

36 - HUSSEIN K.A. et KOCHAKIAN C.D.
Acta Endocr. (Kobenhavn) 59 : 459, 1968
(cité p. 23,63,82,88)

.../...

37 - MAUVAIS-JARVIS P., BERCOVICI J.P., CREPY O et GAUTHIER F
J. Clin. Investigation 49 : 31, 1970
(cité p. 46,89)

38 - MORFIN R.F., ALIAPOULIOS M.A. et CHAMBERLAIN J. et OFNER P.
Endocrinology, 87 : 394, 1970
(cité p. 46,53,68)

39 - MAINWARING W.I.P.
J. Endocr. 44 : 323, 1969 (cité p. 46)

40 - TVETER K.J. et UNHJEM O
Endocrinology 84 : 963,1969
(cité p. 46,72)

41 - FANG S., ANDERSON K.M. et LIAO Sh.
J. Biol. Chem. 244 : 6584, 1969
(cité p. 46,89,119)

42 - BAULIEU E.E. et JUNG I.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38 : 599, 1970 (cité p. 46)

43 - OFNER P., MORFIN R.F., VENA R.L. et ALIAPOULIOS M.A.
Third Tenovus Workshop Proc, Griffiths K. et Pierrepoint C.G. (éditeurs)
1970, sous presse (cité p. 47,65,66,120)

44 - MILLIGAN R.M.
Amer J. Path. 20 : 865,1944 (cité p. 47)

45 - HUGGINS C. et MOULDER P.V.
Cancer Res. 5 : 510,1945 (cité p. 2,47)

46 - PIERREPOINT C.G., GALLEY J. McI., GRIFFITHS K et GRANT J.K.
J. Endocr. 38 : 61, 1967 (cité p. 47)

47 - HUGGINS C. et CLARK P.J.
J. Exp. Med. 72 : 747, 1940
(cité p. 2,47)

48 - LEAV I., CAVAZOS L.F., LEEDS E.B., MORFIN R.F. et OFNER P.
Programm 51 st Meeting Amer. Endocr. Soc. New York 1969, (abstract 268)
(cité p. 47)

49 - LEEDS E.B. et LEAV I.
J. Amer. Vet. Med. Ass. 154 : 925, n°8, 1969
(cité p. 47)

.../...

50 - LACROIX J.V.
N. Amer. Vet. 15 : 40, 1934 (cité p. 48)

51 - KOCHAKIAN C.D. et HUSSEIN K.A.
Program 49 th Meeting Amer. Endocr. Soc. Bal Harbour, 1967, (abstract n° 36) (cité p. 63,67)

52 - SHIMIZAKI J., KURIHARA H., ITO Y. et SHIDA K.
Gumma J. Med. Sci. 14 : 313, 1966 (cité p. 65,66,117)

53 - FARNSWORTH W.E.
Invest. Urol. 6 : 423, 1969 (cité p. 3,66)

54 - MAUVAIS-JARVIS P. et BERCOVICI J.P.
C.R. Acad. Sci. (Paris) 264 : 2825, 1967 (cité p. 66)

55 - MAUVAIS-JARVIS P., BERCOVICI J.P. FLOCH H.H.
Rev. Franç. Etud. Clin. Biol. 14 : 159, 1969 (cité p. 66)

56 - MANGAN F.R., G.E. NEAL et WILLIAMS D.C.
Biochem. J. 104. : 1075,1967 (cité p. 67)

57 - K.L. YIELDING et TOMKINS G.M.
Recent Progr. Hormone Res. 18 : 467, 1962 (cité p. 67)

58 - CRISS W.E. et Mc KERNS K.W.
Biochim. Biophys. Acta 184 : 486, 1969 (cité p.67)

59 - H. SCHRIEFERS
Vitamins Hormones (NY) 25 : 271, 1967 (cité p. 68)

60 - PURVES H.D. et GRIESBACH W.E.
J. Endocr. 14 : 361, 1957 (cité p. 68)

61 - GRAYHACK J.T.
dans Vollmer E.P. et Kauffmann G. (éditeurs), Nat. Cancer. Inst. Monog. 12 : 189, 1963 (cité p. 68)

62 - LIMA-De-FARA A.
Handbook of Molecular cytology, North Holland Publishing Co., Amsterdam; 1969, p. 251, 277 (cité p. 68)

63 - LIAO Sh. et FANG S.
Vitamins Hormones (NY) 27 : 17, 1969 (cité p. 2,3,68,120)

64 - SHIMIZAKI J., MATSUSHITA I., FURUYA N., YAMANAKA H. et SHIDA K.
Endocrinologia Japonica (Tokyo) 16 : 453, 1969 (cité p. 69)

65 - WASSERMANN G.F. et EIK-NES K.B.
Acta Endocr. (Kobenhavn) 61 : 33, 1969 (cité p. 70)

.../...

66 - BUTENANDT, GUNTHER et TURBA
Z. Physiol. Chem. 322 : 28, 1960 (cité p. 72)
67 - WILSON J.D.
Communication privée (cité p. 73)
68 - GLOCK G.E., Mc LEAN P.
Biochem. J. 61 : 381, 1955 (cité p. 82)
69 - LIEBERMAN S., PRAETZ B. HUMPHRIES P. et DOBRINER K
J. Biol. Chem. 104 : 491, 1953 (cité p. 84)
70 - SCHUBERT K et WEHRBERGER K.,
Z. Physiol. Chem. 328 : 173, 1962 (cité p. 84)
71 - DORFMAN R.I. et SHIPLEY R.A.
"Androgens" John Wiley & sons, Inc, New York, 1956, p. 118 (cité p.85)
72 - OFNER P., SMAKULA E.E., WOTIZ H.H., LEMON H.M. et MESCON H
Biochem. J. 66 : 53 P, 1957 (abstract) (cité p. 88)
73 - OFNER P., SMAKULA E.E., WOTIZ H.H., LEMON H.M. et MESCON H
Biochem. Biophys. Acta. 100 : 247, 1965 (cité p. 88)
74 - FARNSWORTH W.E., BROWN J.R., LANO C. et CROSS A.
Fed. Proc. 21 : 211, 1962 (cité p. 88)
75 - ACEVEDO H.F., GOLDZIEHER J.W.,
Biochem. Biophys. Acta 82 : 118, 1964 (cité p. 4,88)
76 - ACEVEDO H.F., GOLDZIEHER J.W.
*Biochem. Biophys. Acta. 97 :*564, 1965 (cité p. 4,88)
77 - HUNTER J.,
In "Observations of certain parts of the animal oeconomy" 2nd, ed. London, 1792, p. 44 (cité p.2)
78 - STARLING E.H.
*Lancet II : 339,*1905 (cité p.2)
79 - LACASSAGNE A.
Compt. Rend. 113 : 590, 1933 (cité p.2)
80 - LACASSAGNE A. et VILLELA E.
Compt. Rend. 114 : 810, 1933 (cité p.2)
81 - BURROWS H. et KENNAWAY N.M.
Am. J. Cancer. 20 : 48, 1934 (cité p.2)
82 - WILLIAMS-ASHMAN H.G.
Cancer Res. 25 : 1096, 1965 (cité p.2)

.../...

83 - WILLIAMS-ASHMAN H.G.
in "On cancer and hormones : essays in experimental biology" (E. Boyland et Coll. eds. Univ. of Chicago Press, Chicago, Illinois, 1962, pp.325-346 (cité p. 2)

84 - WILLIAMS-ASHMAN H.G. et SHIMIZAKI J.
in " Endogenous factors influencing host-tumor balance" (R.W. Wissler, T.L. Das et S. Wood, Jr., eds.) Unive. of Chicago Press, Chicago, Illinois, 1967, pp. 31-41 (cité p. 2)

85 - WILLIAMS-ASHMAN H.G., LIAO S., HANCOCK R.L., JUNKOWITZ L. et SILVERMAN D.A.
Recent Progr. Hormone Res. 20 : 247, 1964 (cité p.2)

86 - VOLLMER E P. et KAUFFMANN G.
Natl. Cancer Inst. Monograph. 12, (1963) (cité p. 2,5)

87 - PRICE D. et WILLIAMS-ASHMANN H.G.
In "on sex and internal secretions" (N.C. Young, ed. 3rd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1961, pp. 366-488 (cité p. 2)

88 - MANN T.
"The biochemistry of semen and of male reproductive tract", Methuen, London, 1964 (cité p.2)

89 - EL-ATTAR T., MOSEBACH K.O. et DIRSCHERL W.
Acta Endocrinol. 45 : 437, 1964 (cité p. 3)

90 - GREER D.S.
Endocrinology 64 : 898, 1959 (cité p. 3)

91 - WOTIZ H.H. et LEMON H.M.
J. Biol. Chem. 206 : 525, 1954 (cité p. 4)

92 - BREUER H., NOCKE L. et PECHTHOLD I.
Z. Vitamin, Hormon , Ferment, Forsch 10 : 106, 1959 (cité p. 4)

93 - FARNSWORTH W.E.
Steroids 6 : 519, 1965 (cité p. 4)

94 - FARNSWORTH W.E.
Steroids 8 : 826, 1966 (cité p. 4)

95 - CHAMBERLAIN J., JAGARINEC N., et OFNER P.
Proc. 2nd Intern. Congr. Hormonal Steroids, Milan, Excerpta Med. Inter. Congr. Ser. No 111, Exerpta Med. Found., Amsterdam, 1966, Abst. n° 490 (cité p.5)

96 - CAVALLERO C.
Acta Endrocrinol. 55 : 119, 1967 (cité p. 5)

.../...

97 - LASNITZKI I.
J. Endocrinol. 30 : 225, 1964 (cité p. 6)

98 - LASNITZKI I.
J. Natl. Cancer Inst. 35 : 339, 1965 (cité p.6)

99 - BAKER K.P.
J. Small Animal Pract. 8 : 639, 1967 (cité p.122)

100 - NEILSON S.W., AFTOSMIS
J.A.V.M.A. 144 : 127, 1964 (cité p. 122)

101 - MENINI E. et NORYMBERSKI J.K.
Biochem. J. 95 : 1, 1965 (cité p.124)

102 - MENINI E., ORR J.C., GIBB R. et ENGEL L.L.
dans *"Gas chromatography of steroid hormones". R. Scholler, ed. , Gordon and Breack, New York,* pp. 41-64, 1968 (cité p. 124)

103 - IRMSCHER K., BEERSTECHER W., METZ H., WATZEL P. et K.H. BORK
Chem. Ber. 97 : 3 363, 1964 (cité p. 125)

104 - LISBOA B.P., GUSTAFSSON et SJOVALL J.
Eur. J. Biochem. 4 : 496, 1968 (cité p. 125)

105 - GUSTAFSSON J.A., LISBOA B.P. et SJOVALL J.
Eur. J. Biochem. 6 : 317, 1968 (cité p. 126)

106 - SIITERI P.K. et WILSON J.D.
52nd meeting of Endoc. Soc., 1970, abstract n°78 (cité p. 133)

107 - GELLER J. et BARON A.
Program 51st meeting amer. Endocr. Soc. New York, 1969, abstract n° 20 (cité p.80)

108 - TAIT S.A.S, TAIT J.F., OKAMOTO M. et FLOOD C.
Endocrinology 81, 1 213, 1967 (cité p. 117)

109 - MORFIN R.F., LEAV I. OFNER P. et ORR J.C.
(Sponsor L.L. Engel), *Federation Proceedings 29,* 247, abstract n°2, 1970. (cité p. 131)

110 - SEGALOFF A
Steroids 1 : 299, 1963 (cité p. 5)

Vu et approuvé

Paris, le 17 Décembre 1970

Le Doyen de la Faculté des Sciences de Paris

L. GAUTHIER

Vu
et permis d'imprimer

Recteur de l'Académie de Paris
R. MALLET

Sc. 3°C. 67.05 (6)